

대한민국 특허청  
KOREAN INTELLECTUAL  
PROPERTY OFFICE

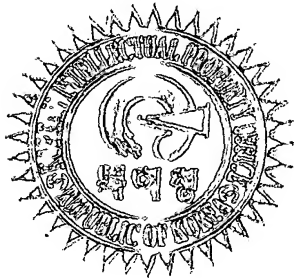
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0021746  
Application Number

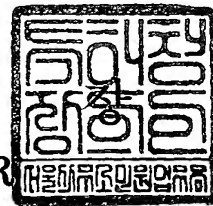
출원년월일 : 2003년 04월 07일  
Date of Application APR 07, 2003

출원인 : 한국원자력연구소  
Applicant(s) KOREA ATOMIC ENERGY RESEARCH INSTITUTE



2003 년 08 월 11 일

특 허 청  
COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.04.07
【발명의 명칭】	항암 , 면역 및 조혈 기능 증진 효과와 산화적 생체 손상의 억제 효과를 갖는 생약조성물과 그 제조방법
【발명의 영문명칭】	The pharmaceutical composition and its preparation method of herb mixture for cancer inhibition, recovery of immune system and protection of body from oxidative damage
【출원인】	
【명칭】	한국원자력연구소
【출원인코드】	3-1998-007760-9
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-039963-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조성기
【성명의 영문표기】	J0,Sung Kee
【주민등록번호】	540916-1011618
【우편번호】	302-282
【주소】	대전광역시 서구 월평2동 무궁화아파트 105동 405호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성호
【성명의 영문표기】	KIM,Sung Ho
【주민등록번호】	600927-1670319
【우편번호】	500-762
【주소】	광주광역시 북구 각화동 471번지 금호아파트 1동 303호
【국적】	KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 이성태  
**【성명의 영문표기】** YEE, Sung Tae  
**【주민등록번호】** 580913-1090518  
**【우편번호】** 540-090  
**【주소】** 전라남도 순천시 용당동 동아아파트 103동 1607호  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 박혜란  
**【성명의 영문표기】** PARK, Hae Ran  
**【주민등록번호】** 760113-2408511  
**【우편번호】** 306-824  
**【주소】** 대전광역시 대덕구 중리동 407-18  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 오헌  
**【성명의 영문표기】** OH, Heon  
**【주민등록번호】** 731223-1654321  
**【우편번호】** 502-280  
**【주소】** 광주광역시 서구 유촌동 버들마을 주공아파트 108동 1604호  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 변명우  
**【성명의 영문표기】** BYUN, Myung Woo  
**【주민등록번호】** 540915-1810237  
**【우편번호】** 305-333  
**【주소】** 대전광역시 서구 관저동 신선마을아파트 210동 1602호  
**【국적】** KR

**【심사청구】**

청구

**【취지】**

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 이원희 (인)

**【수수료】**

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 41 면 41,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 10 항 429,000 원

【합계】 499,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 249,500 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)\_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 항암, 면역 및 조혈기능 증진 및 산화적 손상에 대한 생체 방호용 생약 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물; 및 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물에 에탄올을 가하여 생성된 침전물인 다당체분획물로 구성되는 생약조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 뛰어난 항암 효과, 면역 및 조혈기능 증진효과 및 산화적 생체손상 억제효과를 나타내어 항암제 및 방사선 치료시 발생하는 면역 및 조혈기능 장애의 회복 촉진 및 산화적 손상 억제를 통한 항암치료 부작용 방지를 위하여 응용될 수 있으며, 다양한 퇴행성 만성질환의 예방 및 노약자를 위한 건강증진에 광범위하게 이용될 수 있다.

**【대표도】**

도 1

**【색인어】**

당귀, 천궁, 백작약,

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

항암, 면역 및 조혈 기능 증진 효과와 산화적 생체 손상의 억제 효과를 갖는 생약조성물과 그 제조방법{The pharmaceutical composition and its preparation method of herb mixture for cancer inhibition, recovery of immune system and protection of body from oxidative damage}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은 열수추출물의 성분별 분획물 및 본시료의 면역세포 활성화 효과를 나타낸 그래프이고,

C: 대조군, W: 열수추출물, P: 다당체분획 M: 메탄올분획, E: 에탄올분획

도 2a는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본시료의 조혈전구세포의 증식효과에 따른 조혈기능 증진 효과를 나타낸 그래프이고,

도 2b는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본시료의 골수간질세포 증식효과에 따른 조혈기능 증진 효과를 나타낸 그래프이고,

도 3a은 열수추출물의 성분별 분획물 및 본시료의 방사선 조사에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 억제효과를 나타낸 그래프이고,

도 3b은 열수추출물의 성분별 분획물 및 본시료의 과산화수소수에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 억제효과를 나타낸 그래프이고,

도 4a는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본시료의 방사선 조사에 의한 산화적 손상에 대한 각 시료의 억제 효과를 나타낸 그래프이고,

도 4b는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본시료의 과산화수소수에 의한 산화적 손상에 대한 각 시료의 억제 효과를 나타낸 그래프이고,

도 5a는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본 시료의 방사선 조사에 의한 지질 과산화에 대한 억제 효과에 따른 지질의 산화적 손상에 대한 억제 효과를 나타낸 그래프이고,

도 5b는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본 시료의 사염화탄소에 의한 지질 과산화에 대한 억제 효과에 따른 지질의 산화적 손상에 대한 억제 효과를 나타낸 그래프이고,

도 5c는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본 시료의 방사선 조사에 의한 단백질 과산화에 대한 억제 효과에 따른 단백질의 산화적 손상에 대한 억제 효과를 나타낸 그래프이고,

도 6a는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본 시료의 DPPH 라디칼 소거 효과를 나타낸 그래프이고,

도 6b는 열수추출물의 성분별 분획물 및 본 시료의 OH 라디칼 소거 효과를 나타낸 그래프이고,

도 7a은 본 시료투여에 의한 수컷생쥐에서의 종양 생장의 억제효과(수명연장효과)를 나타낸 그래프이고,

도 7b는 본 시료투여에 의한 암컷생쥐에서의 종양 생장의 억제효과(수명연장효과)를 나타낸 그래프이고,

도 8은 본 시료의 암세포 생장에 대한 영향을 나타낸 그래프이고,

도 9a는 본 시료의 NK 세포 활성화를 통한 암세포 살해능에 따른 항암·면역반응 증강 효과를 나타낸 그래프이고,

도 9b는 본 시료의 대식세포 활성화를 통한 암세포 살해능에 따른 항암·면역반응 증강 효과를 나타낸 그래프이고,

도 9c는 본 시료의 살해 T 세포 활성화를 통한 암세포 살해능에 따른 항암·면역반응 증강 효과를 나타낸 그래프이고,

도 10a는 본 시료의 총백혈구수 재생성 촉진 효과에 따른 혈액 세포 재생성 촉진 효과를 나타낸 그래프이고,

도 10b는 본 시료의 림프구(면역세포) 재생성 촉진 효과에 따른 면역 세포 재생성 촉진 효과를 나타낸 그래프이고,

도 11a는 방사선 조사 후 14일째의 본 시료에 의한 면역세포 아군별 재생성 촉진 효과를 나타낸 그래프이고,

도 11b는 방사선 조사 후 47일째의 본 시료에 의한 면역세포 아군별 재생성 촉진 효과를 나타낸 그래프이고,

도 12a는 방사선 조사 후 14일째의 재생성된 B 세포의 항체 생성능 회복 촉진에 따른 본 시료의 재생성된 B 세포의 기능회복에 대한 촉진효과를 나타낸 그래프이고,

도 12b는 방사선 조사 후 25일째의 재생성된 B 세포의 항체 생성능 회복 촉진에 따른 본 시료의 재생성된 B 세포의 기능회복에 대한 촉진효과를 나타낸 그래프이고,



도 13a는 방사선조사 후 21일째의 본 시료의 재생성된 T 세포의 기능(동종 이계 세포에 대한 반응)회복에 대한 촉진효과를 나타낸 그래프이고,

도 13b는 방사선조사 후 36일째의 본 시료의 재생성된 T 세포의 기능(동종 이계 세포에 대한 반응)회복에 대한 촉진효과를 나타낸 그래프이고,

도 14a는 본 시료의 방사선 조사 후 IgG 생산 감소에 대한 회복 효과에 따른 항체 생성 패턴의 변동에 대한 조정효과를 나타낸 그래프이고,

도 14b는 본 시료의 방사선 조사 후 IgE 생산 과잉에 대한 감소 효과에 따른 항체 생성 패턴의 변동에 대한 조정효과를 나타낸 그래프이고,

도 15는 본 시료의 방사선 조사 후 재생성된 NK 세포의 활성화(암세포 살해능)의 회복 촉진효과를 나타낸 그래프이다.

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<31> 본 발명은 항암, 면역 및 조혈기능의 증진 및 산화적 손상에 대한 생체 방호용 생약조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물; 및 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물에 에탄올을 가하여 생성된 침전물인 다당체분획물로 구성되는 생약조성물에 관한 것이다.

<32> 암 치료는 크게 수술, 항암제 투여 및 방사선 조사등 암세포를 직접 살해하는 방법과, 면역요법과 같이 암세포를 제거하는 생체내 면역기능을 활성화하여 치료하는 방법으로 대별될 수 있다. 종래는 주로 전자의 직접 살해하는 방법을 사용하였으나, 근자에는 후자의 면역요법과 병용요법을 활용하고 있다. 면역요법에 대하여, 최근 면역기능의 작용 기작이 알려짐에 따라 특히 면역조절물질을 이용하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 면역조절물질은 비특이적으로 생체내 면역세포들을 자극하여 생체 면역기능을 증진시킴으로써 질병요인에 대한 생체의 방어력을 증강시킨다. 이와 같은 비특이적 면역조절물질로서 사멸시킨 세균체, 화학합성물질(합성된 핵산유도체 또는 배당체), 생물체제(사이토카인 또는 호르몬) 등을 들 수 있으며 이를 투여하여 생체 면역기능을 증진시킴으로써 항암효과를 얻으려는 연구가 수행되고 있다. 그러나 이들 비특이적 면역조절물질 대부분이 독성 또는 부작용 때문에 실제 임상적 적용에는 많은 한계를 보이고 있다. 특히, 면역반응에 관련된 생체내 인자(cytokines)이 밝혀지면서 이 인자들을 유전공학적으로 대량생산하여 암치료에 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉, 인터루킨-2(interleukin-2)을 비롯한 면역 자극제, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 등에 의한 항암 효과를 얻고자 하였으나 이 역시 심한 독성 때문에 극히 제한적으로 연구되고 있는 실정이다.

<33> 한편, 조혈기능은 골수의 혈액모세포로부터 면역세포를 포함한 여러 가지 혈액세포를 생성하는 기능으로서, 생체의 면역활성과 밀접한 관계가 있다. 특히, 근래에 혈액모세포로부터 혈액세포로 분화하는 각 단계에 작용하는 인자들 (cytokines)이 알려지면서 과립구 집락 형성 촉진 인자(granulocyte colony - stimulating factor, GM-CSF)와 같

은 조혈세포 증식 유도인자 등을 질병치료에 이용하려는 연구가 활발히 진행되었다. 그러나 이들 인자들 역시 효과를 얻기 위해서는 대량을 인체에 투여하여야 하고, 그 경우 대부분이 심한 독성을 나타내기 때문에, 일부 제한적인 용도로만 활용되고 있는 실정이다.

<34> 한편, 암 치료를 위한 항암제 요법 또는 방사선 요법 시행시 조혈계 장애 및 재생 조직의 손상 등의 부작용이 수반된다. 이 부작용은 항암제 또는 방사선에 의한 생체조직의 산화적 손상에 기인한다. 방사선으로부터 생체를 방호할 수 있는 물질에 대한 연구는 1949년 치올(thiol)기를 함유한 시스테인(cysteine)이 방사선 방호효과를 나타낸다는 보고가 있는 후에 아미노치올(aminothiols) 유도체들(특히 WR시리즈)에 집중되었으나 아미노치올유도체의 독성 때문에 실제 응용에는 한계를 보였다. 그 후 디피리다몰(dipyridamole), 아데노신모노포스페이트(adenosine monophosphate), 데옥시스퍼구알린(deoxyspergualin)등 화학합성제를 중심으로 그 방호 효과를 연구하였으나, 이들 또한 자체의 심각한 독성 때문에 실제 적용에는 한계를 보였다. 그 다음으로, 항암 면역활성 조절물질로 연구되어 온 글루칸(glucan) 등의 다당체와 OK-432 등의 무독화된 세균체 등으로 면역조혈계를 자극시킴으로써 방호효과를 얻으려는 연구가 시도되었으나 역시 부작용 때문에 실용화는 극히 제한적이었다. 또한 근래에는 면역반응 및 조혈기능에 관련된 인자 즉 인터루킨-1(interleukin-1)을 비롯한 면역 자극제, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF), 과립구 집락 형성 촉진 인자 (granulocyte colony-stimulating factor, GM-CSF)와 같은 조혈세포 증식 유도제, 호르몬 등에 의한 방사선 방호 효과를 얻고자 하였으나 역시 독성 때문에 극히 제한적으로 시도되고 있다.

<35>       이상에서 살펴본 바와 같이, 면역기능의 활성화를 통한 항암 효과 및 면역 기능 및 조혈기능을 증진시킴과 동시에 항암 치료를 위한 방사선 조사 등의 부작용으로부터 생체를 보호할 수 있는 물질로서 그 안전성이 담보된 물질의 확보가 절실하다. 따라서, 최근에는 천연물로부터 부작용이 없는 천연생리활성물질의 개발 연구가 다수 수행되고 있다. 특히, 방사선 또는 화학물질 뿐만아니라 유해활성 산소 또는 자유라디칼 등에 의한 산화적 생체 손상이 노화, 암 발생 등 여러 가지 질병의 원인임이 밝혀짐에 따라, 항산화물질을 이용한 질병의 예방 및 치료 연구가 수행되어 왔다. 그리고 이들 천연물로부터 생체조절 및 생체방어에 효과가 있는 생리활성물질의 탐색이 활발히 진행되어 건강 보조식품이나 치료제로서 산업화에 이르고 있다.

<36>       천연물로부터 면역조절물질 탐색에 대한 연구는 천연 식물소재 또는 기존의 한방제의 효과 검증을 중심으로 수행되어 왔으며, 일부는 실용화 단계에 와 있다. 방사선에 의한 조혈기능 장애 개선을 위한 천연물의 효능에 관한 연구로는 1988년 프랑스에서 가시오가피의 효능을 검색한 보고가 있으며, 주로 일본, 대만, 중국을 중심으로 인삼, 천연안료, 만삼, 천궁, 영지와 몇 가지 기존의 한방제에 대한 연구가 최근까지도 진행되고 있다.

<37>       본 발명자들은 방사선 치료 부작용 극복 물질을 탐색하는 과정에서, 방사선에 의한 장애는 면역기능 장애, 조혈기능 장애, 재생조직의 손상 등이 복합적으로 일어나는 현상임을 감안하여 각각에 유효한 생약재를 검색한 결과를 바탕으로 모든 장애를 동시에 극복할 수 있는 복합제를 얻고자 하였다. 그 결과 당귀, 천궁 및 백작약을 동일 무게 비율로 혼합하고 열수추출하여 기존의 면역증강제 보다 높은 안전성을 갖는 생약추출물을 제조하여 특허출원한 바 있다(대한민국 특허출원 제 2000-23772호). 그러나, 상기의 발

명에서는 면역기능 및 조혈기능에서 광범위하게 효과를 보이기는 하지만 증진효과의 정도가 상기 생약추출물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 2~3배 정도이며, 항암 면역반응 활성화에는 미약한 효과를 보였다.

**【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】**

- <38> 본 발명의 목적은 당귀, 천궁 및 백작약을 이용하여, 기존의 면역 및 조혈기능 증진에 관한 생물화학적 제제들보다 뛰어난 항암 효과, 면역 및 조혈기능 증진효과 및 산화적 생체손상 억제효과를 나타내는 생약 조성물을 제공하는 것이다.
- <39> 본 발명의 다른 목적은 상기 생약 조성물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- <40> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 생약 조성물을 유효성분으로 포함하는 기능성 식품을 제공하는 것이다.

**【발명의 구성 및 작용】**

- <41> 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물; 및 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물에 에탄올을 가하여 생성된 침전물인 다당체분획물로 구성되는 생약조성물을 제공한다.
- <42> 본 발명은 또한 상기 생약조성물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료용, 면역기능 증강용, 조혈기능 증진용, 산화적 손상에 대한 생체 방호용 및 항암치료 부작용 방지용 약학적 조성물을 제공한다.

- <43>        본 발명은 또한 상기 생약조성물을 포함하는 기능성 식품을 제공한다.
- <44>        본 발명은 또한 1) 동일 무게 비율의 당귀, 천궁 및 백작약으로 이루어진 혼합 생약재에 상기 생약재의 총 무게의 5 내지 20배 량의 물을 가한 후 열수추출하여 열수추출물을 준비하는 제 1단계; 2) 상기 제 1단계와 동일한 열수추출물에 에탄올을 가하여 얻어진 침전물을 회수하여 다당체분획물을 얻는 제 2단계; 3) 제 1단계의 열수추출물에 제 2단계의 다당체분획물을 첨가하여 혼합 조성물을 얻는 제 3단계를 포함하여 이루어진 생약조성물의 제조방법을 제공한다.
- <45>        본 발명자들은 동일 무게 비율의 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물에 서, 항암효과, 면역기능 및 조혈기능 증진 그리고 산화적 손상에 대한 생체 방호기능을 수행하는데 특히 유효한 성분이 있을 것이고, 그 성분을 밝힘으로써 기존에 비해 보다 상승된 항암효과 등을 갖는 생약조성물을 개발할 수 있을 것이라고 생각하였다.
- <46>        이에, 동일 무게비율의 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물을 메탄올분획, 에탄올분획 및 에탄올 침전물인 다당체분획의 성분 분획별로 분리한 후, 각종 실험을 수행하여, 에탄올 침전물인 다당체분획이 항암효과, 면역기능 및 조혈기능 증진효과에서 탁월함을 확인하였다. 다만, 산화적 손상에 대한 생체 방호기능면에서는 메탄올분획과 에탄올분획에 비해 다당체분획의 효과가 다소 미흡하였다.

- <47> 따라서, 본 발명자들은 동일 무게 비율의 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물과, 상기 열수추출물에 에탄올을 가하여 생성된 침전물인 다당체분획을 조합하여 다당체분획의 비율을 증가시키면 산화적 손상에 대한 생체 방호기능, 조혈기능 증진 효과뿐만 아니라 항암효과 및 면역기능을 보다 향상시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성한 것이다.
- <48> 이하에서는 첨부된 도면을 참조하여, 우선 동일 무게비율의 당귀, 천궁, 및 백작약의 열수추출물의 성분 분획별 효과를 보여줌으로써 상기 열수추출물에 에탄올 침전물인 다당체분획을 혼합하여 다당체분획의 비율을 증가시키면 여러 가지 효과를 동시에 구현할 수 있음을 보여준 후, 그 후에 실제로 열수추출물에 다당체분획을 혼합한 본 발명에 따른 생약조성물에 대해서, 실험예 등을 통해서 보다 상세히 설명하도록 하겠다.
- <49> 열수추출물의 성분 분획별 효과
- <50> (1) 열수추출물의 성분 분획
- <51> 식품원료로서 식품공전에 등재되어 있는 생약재 3가지 즉 당귀, 천궁, 백작약을 음건하고 세절하여 같은 무게 비율로 혼합하였다. 총 무게의 10배 량의 증류수를 가하여 8~10 시간동안 약탕기에서 끓여 추출하여 열수추출물을 준비하였다(열수추출물; W분획). 상기 열수추출물에 메탄올을 가하여 메탄올에 용출되는 성분을 모은 메탄올분획(M분획), 상기 열수추출물에 에탄올을 가하여 에탄올에 용출되는 성분을 모은 에탄올분획(E분획) 및 상기 열수 추출액에 에탄올을 첨가하여 최종적으로 80% 에탄올 수용액 조건에서 하룻

밤 동안 5~15 °C에 방치한 후 침전된 다당체분획을 회수하여 다당체분획(P분획)을 준비하였다.

<52> (2) 각 성분 분획의 효과

<53> 상기 열수추출물의 성분분획 별로 면역세포 활성화 효과와 조혈기능 증진 효과 및 산화적 생체손상에 대한 억제효과를 확인해보았다.

<54> 첫 번째로, 면역 세포 활성화 효과를 본다.

<55> 비장 면역세포를 시험관 내에서 배양하는 시험계에 상기 준비된 열수추출물의 성분 분획별 시료를 첨가하여 배양할 때, 면역세포가 활성화되면 세포대사가 증폭되고 세포가 분열하게 되기 때문에 유전자(DNA)를 복제하게 된다. 이 때 배양액에 DNA의 전구 물질의 하나인 티미딘(thymidine)에 표지자로 동위원소( $H^3$ )를 붙인 것을 첨가하여 세포가 흡수한 동위원소의 양을 측정하여 면역세포의 활성화 정도를 산정할 수 있다. 즉, 하기의 트리튬 티미딘 흡수 분석법( $H^3$ -thymidine uptake assay) 으로 측정하는데 자세한 시험법은 다음과 같다.

<56> 생쥐의 비장 면역세포(림프구)를 준비하여 소액 배양용 시험관(96-well flat-bottomed microplate)의 각 웰(well)에  $2 \times 10^5$ 개씩 완전배지로 희석하여 분주하고, 시료를 첨가한 다음 세포배양기( $CO_2$ -배양기)에서 3일 동안 배양하였다. 배양 후 웰 당  $1.5 \mu Ci$ 의 트리튬 티미딘( $^3H$ -thymidine)을 첨가한 다음 4시간 더 배양하고 세포수집기(cell harvester)로 세포를 수거하였다. 수거된 세포에 신틸레이션 콕테일(Scintillation cocktail)을 3 ml씩 넣고 베타-신틸레이션 카운터( $\beta$ -scintillation



counter)로 세포가 흡수한 트리튬 티미딘( $^3\text{H}$ -thymidine) 양을 분당 카운트 수(cpm)으로 측정하였다.

<57> 실험결과, 도 1에서 보는 바와 같이, 다당체분획이 가장 현저하게 면역세포를 활성화시키는 것으로 나타났으며 열수추출물보다 3배 이상 높은 효과를 보였다. 한편, 메탄올분획과 에탄올분획은 거의 효과를 보이지 않았다.

<58> 두 번째로, 조혈기능 증진효과를 본다.

<59> 먼저, 조혈전구세포(bone marrow stem cell)의 증식 효과를 본다.

<60> 조혈 전구세포는 골수 세포의 비부착성 세포로서, 단구/대식세포, 혈소판, 적혈구 등으로 분화가 가능하다. 이 조혈 전구세포 배양계에 상기 준비된 열수추출물의 성분 분획별 시료를 첨가하여 배양한 후 조혈전구세포들을 배양 상층액과 같이 회수하고 혈구 계수판으로 세포수를 계수하여 상기 시료의 조혈 전구세포의 증식효과를 확인하였다. 그 결과를 도 2a에 나타내었다.

<61> 도 2a에서 볼 수 있듯이, 열수추출물의 다당체분획이 가장 현저하게 증식시키는 것으로 나타났으며 열수추출물보다 2배 정도 높은 효과를 보였다. 한편, 메탄올분획과 에탄올분획은 열수추출물보다 약한 효과를 보였다.

<62> 다음으로, 골수간질세포(bone marrow stromal cell)의 증식 효과를 본다.

<63> 조혈전구세포가 여러 종류의 성숙세포로 증식 분화하는 과정에는 골수 간질세포(stromal cells)가 분비하는 다양한 조혈인자(단백질인자, 사이토카인 등)가 관여할 뿐만 아니라, 조혈전구세포 주위에 존재하는 간질세포(stromal cells)와의 접촉작용이 매

우 중요하다고 밝혀지고 있다. 따라서, 조혈기능 조절에 있어서 조혈미세환경 내의 간질세포의 역할이 중요한 것으로 생각된다.

<64> 골수간질세포 배양계에 상기 준비된 열수추출물의 성분 분획별 시료를 첨가하여 골수 간질세포의 증식 효과를 확인하였다. 먼저 골수세포를 배양하여 배양접시에 부착하는 간질세포를 분리하였다. 분리된 골수 간질세포를 장기간 배양하면서, 일주일에 한번씩 배지의 반 정도를 새로운 배지로 교환하고, 이때 각 시료를 첨가하여 2-3 주일 정도 계속 배양한 후 증식된 간질세포 수를 세어서 증식 정도를 측정하였다. 그 결과로도 2b에 나타내었다. 도 2b에서 알수 있듯이 다당체분획물이 현저한 증식효과를 보였으며, 상기 열수추출물에 비해 4배 이상의 높은 간질세포 증식효과를 보였다.

<65> 세 번째로, 산화적 생체손상에 대한 억제효과를 본다.

<66> 상기 열수추출물의 각 성분 분획별 시료를 첨가하여 4시간동안 세포배양기에서 배양한 후 방사선 또는 과산화수소수로 처리한 다음, 세포내 DNA 및 염색체의 손상정도를 방사선 대조군과 비교 검토해본 결과를 도 3a와 3b 및 도 4a와 4b에 나타내었다. 도 3a와 3b 및 도 4a와 4b에서 볼 수 있듯이, 세포내 DNA 및 염색체 손상에 대한 억제 효과에서는 다당체분획은 시험모델에 따라 에탄올분획, 메탄올분획, 열수추출물에 비해 다소 높거나 비슷한 수준의 억제 효과를 확인할 수 있다.

<67> 또한, 방사선 및 산화적 손상에 의한 세포막의 지질 및 단백질의 과산화억제효과에 대한 열수추출물의 성분 분획별 효과에 대하여 도 5a ~ 5c에 나타내었다.

<68> 도 5a와 5b에서 볼 수 있듯이 다당체분획은 에탄올분획 또는 열수추출물에 비해 다소 미흡한 억제효과를 나타내었다.

<69> 또한, 생체내에서 형성되는 자유라디칼을 소거하여 산화적 손상을 억제할 수 있는 효과에 대하여 열수추출물의 성분 분석별로 도 6a 및 도 6b에 나타내었다.

<70> 도 6a와 도 6b에서 볼 수 있듯이, 다당체분획은 에탄올분획 또는 메탄올분획에 비해 미흡한 자유 라디칼 소거 효과를 나타냈다.

<71> 이상 설명한 바와 같이, 항암효과, 면역기능 및 조혈기능 증진효과 면에서는 다당체분획이 에탄올분획, 메탄올분획 및 열수추출물에 비해 탁월한 효과를 나타냈으나, 산화적 손상에 대한 생체 방호기능 면에서는 열수추출물이 전반적으로 약간 높은 효과를 나타냈다. 따라서, 열수추출물과 다당체분획을 혼합하여 다당체분획의 비율을 증가시킴으로써, 여러 효과를 동시에 구현할 수 있을 것이다. 이하에서는, 이와 같이 열수추출물과 다당체분획을 혼합하여 다당체분획의 비율을 증가시킨 본 발명에 따른 생약조성물에 대해서 상세히 설명하기로 한다.

<72> 본 발명에 따른 생약조성물

<73> 본 발명에 따른 생약조성물은 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물; 및 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물에 에탄올을 가하여 생성된 침전물인 다당체분획물로 구성된다.

<74> 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 생약조성물은 1) 동일 무게 비율의 당귀, 천궁 및 백작약으로 이루어진 혼합 생약재에 상기 생약재의 총 무게의 5 내지 20배 량의 물을

가한 후 열수추출하여 열수추출물을 준비하는 제 1단계; 2) 상기 제 1단계와 동일한 열수추출물에 에탄올을 가하여 얻어진 침전물을 회수하여 다당체분획물을 얻는 제 2단계; 3) 제 1단계의 열수추출물에 제 2단계의 다당체분획물을 첨가하여 혼합 조성물을 얻는 제 3단계를 포함하여 제조된다.

<75> 이때, 1단계의 열수 추출은 8~10 시간동안 약탕기에서 끓여 추출하는 것이 바람직하며, 이후 여과한 후 감압 농축기로 농축하여 사용할 수 있다. 2단계의 에탄올은 최종적으로 80%의 에탄올 수용액으로 되도록 하는 것이 바람직하며, 이를 하룻밤 동안 5~15 °C에 방치하여 침전시키는 것이 바람직 하다.

<76> 이렇게 회수된 다당체분획물은 제 1단계에서 준비된 열수추출물과 혼합, 동결 건조시켜 분말로 제조하거나 엑스분 그 자체로 사용할 수 있다.

<77> 이때, 상기 생약조성물에 포함되어 있는 다당체 분획물의 총량은, 상기 열수추출물에 포함되어 있는 다당체분획물의 양에 대하여 1.5 ~ 4 배의 양인 것이 바람직하며, 따라서, 상기 제 1단계에서 준비된 열수추출물의 양에 대하여 상기 제 2단계에서 다당체분획물을 얻기 위한 열수추출물의 양은 0.5 ~ 3 배로 하는 것이 바람직하다.

<78> 본 발명은 또한 전술한 생약조성물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 상기 약학적 조성물은 임상투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다.

<79> 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 실제 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화학식 1의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텍솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용 될 수 있다.

<80> 본 발명의 약학적 조성물의 유효용량은 30 ~ 300 mg/kg/day 이고, 바람직하기로는 80 ~150 mg/kg/day 이며, 하루 1 ~ 3 회로 나누어 투여될 수 있다.

<81> 본 발명은 또한 전술한 생약조성물을 유효성분으로 포함하는 기능성 식품에 관한 것으로서, 상기 기능성 식품은 최종 제품의 상품성과 소비자 기호도에 따라 다른 식품소재를 첨가할 수 있다.

<82> 이하, 본 발명의 바람직한 실시예 및 실험예에 대해서 상세히 설명하기로 한다.

<83> [실시예] 생약 조성물의 제조

<84> 식품원료로서 식품공전에 등재되어 있는 생약재 3가지 즉 당귀, 천궁, 백작약을 음건하고 세절하여 같은 무게 비율로 혼합하였다. 총 무게의 10배 량의 증류수를 가하여 8~10 시간동안 약탕기에서 끓여 추출한 다음 여과한 후 감압 농축기로 농축하였다. 농축액의 1/4 ~ 2/3는 보관하고 나머지 1/3 ~ 3/4에 에탄올을 첨가하여 최종적으로 80% 에탄올 수용액 조건에서 하룻밤 동안 5~15 ℃에 방치한 후 침전된 다당체분획을 회수하여, 전 단계에서 보관한 절반의 열수추출물 농축액과 혼합하고 동결 건조시켜 분말로 제조하거나 엑스분 그 자체로 한다. 실험예에서는 동결건조한 것을 증류수에 적정농도로 녹이고, 무균 상태로 적용하기 위하여 무균 여과지(Millipore membrane, 0.45 μm)로 여과하여 시료로 사용하였다.

<85> [실험예 1] 항암 효과 및 면역 기능 증강 효과의 확인

<86> 1) 종양 생장의 억제 효과 (Inhibition of tumor growth)

- <87> 생쥐에 암세포 이식 후 실시예에서 제조한 생약 조성물(이하, 본시료라 함) 및 생리식염수(이하 대조 시료라 한다)를 투여하여 생쥐의 수명 연장 여부를 확인한 결과, 본 발명에 따른 생약 조성물이 종양성장 억제효과가 있음을 확인하였다.
- <88> 생쥐(BDF1, 7주령)에  $1 \times 10^5$ 개의 흑색종양세포(B16F0 melanoma cells)를 복강 주사하였다. 암세포를 복강으로 주사하여 이식한 후 다음날부터 본 시료 및 대조시료를 10일간 복강 주사하였다. 그 후 시일 경과에 따라 생존 생쥐의 수를 매일 확인하였다.
- <89> 그 결과를 도시한 도 7a에서 보는 바와 같이 암세포를 이식한 수컷생쥐에서는 대조시료를 투여한 대조군의 경우 21일째까지 모든 생쥐가 사망한데 비해 본 시료를 주사한 생쥐는 25일째까지 생존하는 것을 볼 수 있었으며, 생존율이 본 시료를 주사함으로써 약 15% 정도 증가하였다. 반면, 암컷 생쥐에서는 대조 시료를 투여한 대조군의 경우 19일째 모든 생쥐가 죽은데 비해 본 시료를 주사한 생쥐는 24일째까지 약 50%가 생존하였으며, 26일째까지 생존함으로써 생존율이 약 34% 정도 증가하였다(도 7b).
- <90> 따라서, 본 시료는 암세포의 성장을 억제함으로써 항암효과를 나타냄을 알 수 있다.
- <91> 한편, 본 시료가 직접적으로 암세포를 살해하는지를 알아보기 위하여 종양세포 배양 시험관에 본 시료를 첨가한 후 생존 종양세포를 측정하였다. 즉, 흑색종양세포(B16F0 melanoma)를 준비하여 소액 배양용 시험관(96-well flat-bottomed microplate)의 각 웰(well)에  $5 \times 10^4$ 개씩 완전배지로 희석하여 분주하고, 본 시료를 첨가한 후 세포배양기(CO<sub>2</sub> 배양기)에서 배양하였다. 배양 하루 후에 각 웰에 MTT 용액을 넣은 후 4시간을 더 배양하였다. 이 때 살아 있는 세포는 MTT를 포마잔(Formazan)으로 변형시켜 세포 내

에 침착시킨다. 배양 후 각 웰에 0.07N HCl이 포함된 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여, 살아 있는 세포에 침착된 포마잔을 유리시킨 다음, UV - 흡광계를 이용하여 그 양을 파장 570nm에서 측정하여 살아 있는 세포의 상대적인 수로 산정 하였다. 그 결과, 도 8에서 보는 바와 같이 시료를 첨가하지 않은 대조군의 생존 세포 수와 본 시료를 첨가한 시험군의 생존 세포수의 차이가 없었다. 즉, 본 시료는 암세포를 직접적으로는 살해하거나 증식시키지 않음을 알 수 있다.

## <92> 2) 면역기능 증강 효과

### <93> 2.1) 면역세포 활성화 효과 (Lymphocyte proliferation)

<94> 비장 면역세포를 시험관 내에서 배양하는 시험계에 본 시료 및 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁과 백작약의 열수추출물과 그 분획물을 첨가하여 배양할 때, 면역세포가 활성화되면 세포대사가 증폭되고 세포가 분열하게 되기 때문에 유전자(DNA)를 복제하게 되는데 이 때 배양액에 DNA의 전구물질의 하나인 티미딘(thymidine)에 표지자로 동위원소( $H^3$ )를 붙인 것을 첨가하여 세포가 흡수한 동위원소의 양을 측정하여 면역세포의 활성화 정도를 산정하였다. 즉, 트리튬 - 티미딘 흡수 분석법( $H^3$ -thymidine uptake assay)으로 하기와 같이 측정하였다.

<95> 생쥐의 비장 면역세포(림프구)를 준비하여 소액 배양용 시험관(96-well flat-bottomed microplate)의 각 웰(well)에  $2 \times 10^5$ 개씩 완전배지로 희석하여 분주하고, 각각에 본 시료, 열수추출물을 첨가한 다음 세포배양기( $CO_2$ -배양기)에서 3일 동안 배양하였다. 배양 후 웰 당  $1.5 \mu Ci$ 의 트리튬 티미딘( $^3H$ -thymidine)을 첨가한



다음 4시간 더 배양하고 세포수집기(cell harvester)로 세포를 수거하였다. 수거된 세포에 신틸레이션 콕테일(Scintillation cocktail)을 3 ml씩 넣고 베타-신틸레이션 카운터( $\beta$ -scintillation counter)로 세포가 흡수한 트리튬 티미딘( $^3\text{H}$ -thymidine) 양을 분당 카운트 수(cpm)으로 측정하였다.

<96> 실험결과, 도 1에서 보는 바와 같이 본 시료는 상기 열수추출물보다 2배 이상, 대조군의 10배 이상의 현저한 면역 세포 활성화 효과를 보였다.

<97> 2.2) 자연살해세포(NK세포) 활성 증진으로 인한 암세포 살해효과 증진

<98> 암세포를 제거함에 있어 비특이적이며 1차적인 방어체계에 속하는 자연살해세포(NK 세포)의 암세포 살해능이 본 시료의 투여에 의해 증강되는지를 알아보려고 하였다.

<99> 생쥐의 복강으로 본 시료(1mg/mouse)를 하루에 한 번씩 3일간 주사하고, 하루 후에 생쥐를 희생시켜 분리한 비장면역세포를 작동세포로 하여, 하기와 같이 크롬 유리법(Chromium Release Assay)으로 표적세포(암세포) 살해능을 측정하였다.

<100> 표적세포로서 암세포(YAC-1 세포)  $2 \times 10^6$ 개에  $40 \mu\text{Ci}$   $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 를 넣고  $37^\circ\text{C}$  항온조에서 1시간 동안 표지(labelling) 하였다. 그 후 준비된 작동세포인 비장세포와 크롬( $\text{Cr}^{51}$ )이 표지된 표적세포인 암세포(YAC-1 세포)의 비율이 50:1 및 100:1이 되게 소액 배양용 시험관(96-well microplate)의 각 웰에 분주하여 배양하였다. 4시간 배양 후 각 웰의 상등액  $100 \mu\text{l}$ 씩을 취하여 시험관에 분주하고, 암세포가 살해되어 배양액으로 유리된 크롬의 양을 감마카운터( $\gamma$ -counter)에서 분당 카운트 수(cpm)로 측정하였다. 각 실험은 3배수로 실시하였으며 암세포살해능(%)은 다음 식에 의하여 계산하였다.

&lt;101&gt;

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{ER-SR}}{\text{MR-SR}} \times 100 \quad \dots \dots \dots (\text{수식 1})$$

&lt;102&gt;

여기서 ER(experimental release)은 실험군으로부터 유리된 상층액의 분당 카운트 수, SR(spontaneous release)은 작동세포가 들어있지 않은 표적세포 대조군에서 자연적으로 유리된 상층액의 분당 카운트 수이고, MR(maximal release)은 표적세포( $2 \times 10^4$  cells/well)에 표지된 방사능의 90% 이상으로 하였고 트리톤(triton) X-100 1% 용액을 가하여 얻었다.

&lt;103&gt;

실험결과, 도 9a에서 보는 바와 같이 자연살해(NK) 세포의 암세포 살해능이 1.5배 정도로 증가하였다.

&lt;104&gt;

2.3) 대식세포(macrophage) 활성화 증진으로 암세포 살해효과 증진

&lt;105&gt;

활성화된 대식세포는 탐식작용뿐만 아니라 직접적으로 암세포를 살해할 수 있다. 본 발명의 생약조성물에 의해 대식세포가 활성화되어 암세포를 살해할 수 있는지 알아보았다. 복강 대식세포를 수거하여 소액 배양용 시험관(96-well flat bottomed microplate)에 웰 당  $2 \times 10^5$  개씩 분주하고 본 시료를 농도별로 첨가하여 24시간 배양하였다. 각 웰을 3번 세척한 후 배양된 대식세포를 작동세포로 하여 표적 암세포에 대한 살해능을 상기한 크롬 유리법으로 측정하였다.

&lt;106&gt;

배양된 대식세포가 들어 있는 소액 배양용 시험관(96-well microplate)의 각 웰(well)에 표적세포로서 크롬( $\text{Cr}^{51}$ )으로 표지된 암세포(YAC-1 세포)를 웰당  $5 \times 10^3$  개씩 첨가하여 작동세포와 표적세포의 비율(E:T ratio)이 약 40:1이 되게 하였다. 암세포(YAC-1 세포)를 표적세포로 첨가한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 각 웰의 상등액 100  $\mu\text{l}$ 씩을 취하여 시험관에 분주하고, 암세포가 살해되어 배양액으로 유리된  $\text{Cr}^{51}$ 의 양을

감마카운터( $\gamma$ -counter)에서 분당 카운트 수(cpm)로 측정하였다. 각 실험은 3배수로 실시하였으며 암세포살해능(%)은 상기와 같은 방법으로 (수식 1)에 의하여 계산하였다.

<107> 실험 결과, 도 9b에서 보는 바와 같이 대식세포의 암세포살해능이 음성대조군에서는 약 10% 였으나, 본 시료를 첨가한 실험군에서는 살해능이 약 80% 까지 증가되었으며 이는 양성대조물질인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)와 거의 같은 효과를 보였다.

<108> 한편, 본 시료와 함께 배양한 대식세포는 첨가한 미세입자를 탐식하는 식작용도 증강되었다 (실험결과는 제시하지 않음)

<109> 2.4) T세포 활성화 증진으로 암세포 살해효과 증진

<110> 암세포를 살해하는데 있어 여러 가지 면역세포를 활성화 시키며 더욱 다각적인 면에서 암세포와 대응하기 위해 비특이적 방법이 아닌 특이적 면역계를 활성화 시켜야 하며 이를 담당하는 세포 중에 암세포를 직접적으로 살해할 수 있는 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell)가 존재한다.

<111> 본 발명의 생약조성물에 의해 세포독성 T 세포가 활성화 되어 암세포 살해효과가 증진되는 지를 보기 위해 우선 생쥐의 면역세포를 암세포로 감작시키는 작업이 필요하다. 이를 위해 방사선 조사로 죽은 흑색암세포(B16F0 melanoma)  $1 \times 10^6$  개를 생쥐의 복강에 주사하였다. 암세포를 주사하기 전에 본 시료(1mg/mouse)를 복강으로 3일 동안 1일 1회씩 3번 복강 주사하였으며, 하루 후에 면역세포를 감작 시키기 위해 죽은 암세포를 주사하였다. 그 후 두 번 본 시료를 복강 주사하였다. 암세포를 주사한 후 7일째에 생쥐

를 희생시켜 암세포에 감작된 비장세포를 준비하여 암세포 살해능을 상기한 크롬 유리법으로 측정하였다. 감작된 비장 면역세포를 작동세포로 하고 표적세포로서 크롬이 표지된 흑색암세포(B16F0 melanoma)의 비율이 각각 50:1 그리고 100:1이 되게 소액 배양용 시험관(96-well microplate)의 각 웰(well)에 분주하여 함께 배양하였다. 배양 4시간 후 각 웰의 상등액 100 $\mu$ l씩을 취하여 시험관에 분주하고, 암세포가 살해되어 배양액으로 유리된 Cr<sup>51</sup>의 양을 감마카운터( $\gamma$ -counter)에서 분당 카운트 수(cpm)로 측정하였다. 각 실험은 3배수로 실시하였으며 암세포살해능(%)은 상기와 같은 방법으로 (수식 1)에 의하여 계산하였다.

<112> 실험 결과, 도 9c에서 보는 바와 같이 본 시료의 투여에 의해 세포독성 T 세포의 암세포 살해 능력이 약 2배 정도로 증가하였다.

<113> [실험예 2] 조혈기능 증진효과 및 산화적 손상에 대한 조혈면역계 회복 촉진효과

<114> 1) 조혈기능 증진 효과의 확인

<115> 1.1) 조혈전구세포(골수간세포; Bone marrow stem cells)의 증식효과

<116> 골수세포 배양계에 각 시료를 첨가하여 조혈전구세포의 증식에 미치는 효과를 확인하였다. 골수세포는 생쥐의 대퇴골 내부의 골수를 씻어내어 분리하였다. 골수세포를 배양하면, 배양접시에 부착하는 간질세포(stromal cells)와 부착하지 않고 배양액 내로 분화 증식되어 나오는 비부착성 세포(nonadherent cells)를 관찰할 수 있다. 이 비부착성 세포는 조혈전구세포로서 간질세포와의 접촉작용을 통해 증식하며, 단구/대식세포, 혈소판, 적혈구 등으로 분화가 가능하다. 이 골수세포 배양계에 각 시료를 첨가하여 배

양한 후 비부착성 조혈전구세포들을 배양 상층액과 같이 회수하고 혈구계수판으로 세포 수를 계수하여 각 시료의 증식효과를 확인하였다.

<117> 도 2a에서 보이듯이 본시료는 열수추출물 및 대조군에 비해 각각 1.6배, 7배 가량의 높은 조혈 전구세포 증식효과를 보였다.

<118> 1.2) 골수 간질세포(Bone marrow stromal cells)의 증식 효과

<119> 조혈전구세포가 여러 종류의 성숙세포로 증식 분화하는 과정에는 간질세포(stromal cells)가 분비하는 다양한 조혈인자(단백질인자, 사이토카인 등)가 관여할 뿐만 아니라, 조혈전구세포 주위에 존재하는 간질세포와의 접촉작용이 매우 중요하다고 밝혀지고 있다. 따라서, 조혈기능 조절에 있어서 조혈미세환경 내의 간질세포의 역할이 중요한 것으로 사료된다.

<120> 골수간질세포의 배양계에 각 시료를 첨가하여 증식 효과를 확인하였다. 먼저 골수 세포를 배양하여 배양접시에 부착하는 간질세포를 분리하였다. 분리된 골수 간질세포를 장기간 배양하면서, 일주일에 한번씩 배지의 반 정도를 새로운 배지로 교환하고, 이때 각 시료를 첨가하여 2-3 주일 정도 계속 배양한 후 증식된 간질세포 수를 세어서 증식 정도를 측정하였다.

<121> 그 결과를 도 2b에 나타내었으며 본 시료는 열수추출물 및 대조군에 대하여 2배, 8 배 가량의 높은 골수 간질 세포 증식 효과를 보였다.

<122> 2)산화적 손상에 대한 조혈면역계 회복 촉진효과의 확인

<123> 2.1) 방사선 처리 후 조혈기능 회복 촉진효과 : 혈액세포(면역세포) 및 비장내 면역세포의 재생성 촉진효과

<124> 동물에 방사선을 조사시키면 혈액 세포가 급격하게 소실되고 그 후 시일경과에 따라 서서히 혈액세포 수가 회복되는 것으로 알려져 있다.

<125> 본 실험에서는 방사선(용량 5그레이)을 조사시킨 생쥐에 본 시료를 투여한 후 혈액 세포 및 비장림프구의 수가 회복되는 정도를 분석하였다. 본 시료 투여는 생쥐에 방사선을 조사하기 36시간 및 12 시간 전에 그리고 조사 후 30분 및 24시간에 복강주사로 하였으며, 그 이후 격일로 3회 복강주사로 실시하였다.

<126> 혈액세포의 분석은 방사선 조사 후 생쥐의 안와정맥에서 혈액을 취하여 동물혈액세포 분석기를 이용하여 시행하였다.

<127> 비장 내 면역세포(림프구)의 아군(subtype)별 분석은 유속세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 시행하였다. 준비한 비장면역세포를 유속세포분석 배지(식염수에 0.1% bovine serum albumin과 0.1% sodium azide를 첨가한 것)으로 세척하여 각 시험관에  $10^6$ 개의 세포수로 조정하여 분주하였다. 세포 아군별 표지 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 수용체(Fc  $\gamma$  R III/II)를 봉쇄하기 위해 anti-CD16/CD32 항체를 첨가하여 4℃에서 5분간 정치하였다. 그 후 각 시험관에 표지하고자 하는 표식자에 대한 단일클론 항체를 각각 첨가하여 4℃에서 40분간 정치하였다. 표지에 사용된 단일클론항체는 B 세포를 위해서는 항-Ig M(anti-IgM) 항체, 전체 T 세포를 위해서는 항-Thy1.2(anti-Thy1.2) 항체, 보조 T 세포를 위해서는 항-CD4(anti-CD4) 항체, 세포독성

T 세포를 위해서는 항-CD8(anti-CD8) 항체를 사용하였으며, 모두 형광물질이 부착된 단일클론 항체를 사용하였다. 표지 후 유속세포분석 배지로 2번 세척하여 유속세포분석기(FACStar; CULTER, USA)로 세포표면 표식자에 결합된 단일클론항체의 양을 세포 당으로 분석하였다.

<128> 그 결과, 도 10a 와 도 10b에서 보이는 바와 같이 방사선 조사 생쥐에 본 시료를 투여한 군은 혈액의 총 백혈구 수(도 10a)와 림프구 수(도 10b)가 3주 후부터 거의 정상 대조군 수준으로 회복되어 방사선 조사 대조군에 비해 현저하게 높게 나타났으므로, 본 시료에 의해 혈액세포 수의 회복이 촉진됨을 알 수 있다. 반면, 방사선조사 대조군은 약 7주 후에야 정상대조군 수준으로 회복됨을 볼 수 있다.

<129> 또한 비장 내 면역세포(비장림프구)의 각 아군별로 회복 정도를 분석한 결과, 도 11a에서 보는 바와 같이 방사선 조사 후 14일째 측정된 경우 본 시료 투여군에서 전체 비장림프구의 수가 방사선 대조군에 비해 월등히 높게 회복되었으며, 각 면역세포 아군별로 보면 B 세포는 거의 정상 수준까지 회복된 반면 T 세포와 그 T세포의 각 아군들은 방사선 대조군보다는 높게 회복이 되었지만 정상대조군의 50%를 못 미치는 회복도를 보였다. 방사선 조사 후 47일째 측정된 경우에는, 도 11b에 나타난 바와 같이 방사선 대조군과 본 시료 투여군 모두에서 전체 비장림프구와 B세포의 수가 정상대조군까지 회복이 되었으나, T 세포와 그 아군들의 수는 방사선 조사 대조군에서 약 50% 수준까지 회복되었으며, 반면에 본 시료를 투여한 생쥐에서는 거의 80%까지 회복되었음을 확인할 수 있었다.

<130> 2.2) 방사선 처리 후 재생성된 면역세포의 기능회복 증진효과의 확인

## &lt;131&gt; 2.2.1) 재생성된 B세포의 기능회복 증진효과

<132> 방사선(용량 5그레이) 조사 생쥐에서 재생성된 B 세포의 기능회복을 본 발명의 조성물이 촉진시키는지 알아보기 위하여 항체생성 세포수를 측정하였다.

<133> 본 시료는 방사선 조사 36, 12시간 전과 30분, 24시간 후에 복강으로 주사하였으며, 그 이후 격일로 3번 복강주사를 실시하였다. 방사선 조사 후 14일째와 25일째 C57BL/6 생쥐에 면양적혈구(sheep red blood cell(SRBC))을  $1 \times 10^9$  cells/0.2 ml 씩 꼬리정맥으로 주사하였다. 면양적혈구의 주사 후 만 4일째에 생쥐의 비장림프구를 분리하였다. 분리된 전체 림프구를 세고,  $7 \times 10^6$ 개/ml로 조정하여 얼음에 넣어 놓고, 면양적혈구는 생리식염수로 3번 세척 후 배지에 20%가 되도록 현탁시켜 얼음에 넣어 놓았다. 위의 두 세포를 고정하기 위하여 0.5% 아가로스-RPMI 용액을 45℃ 수욕조(water bath) 내에 준비하였다. 이렇게 준비된 림프구와 면양적혈구, 0.5% 아가로스 용액을 100  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1600  $\mu$ l씩 더하여 가볍게 혼합 후 준비한 세포배양접시에 전량을 부어 고루 퍼지도록 하여 잘 굳도록 정치하였다. 굳은 것을 확인한 후 배양기에 넣어 2시간 배양한 후에 보체(Guinea pig complement; GPC)를 1:70으로 희석하여 각 600  $\mu$ l씩 첨가하고 다시 2시간 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 항체생성 면역세포 주위에 항원-항체 반응에 의해 생성된 용혈 플라크(plaque)를 관찰하고 그 수를 세어 림프구의 희석배수를 고려하여 항체 생성 세포 수 (plaque forming cells(PFC)/spleen)로 환산하였다.

<134> 그 결과는 도 12a 및 도 12b에서 보이는 바와 같다. 방사선 조사 대조군에서는 방사선 조사 후 14일째에(도 12a) B 세포의 수가 약 60%정도 회복(도 11a) 되었음에도 불구하고 B 세포의 기능 즉, 항체생성능은 정상대조군의 약 4% 정도에 미치지 못하고 있으며, 방사선 조사 후 25일째에는(도 12b) B 세포의 기능이 정상대조군에 비해 약 41% 수



준에 미치지 못한다. 반면 본 시료 투여군에서는 방사선 조사 후 14일째와 25일째에 정상대조군의 약 20%와 57% 정도로 B세포 기능의 회복촉진 효과를 보였다. 이러한 결과로 보아, 본 생약조성물은 방사선에 의하여 감소된 B 세포 수의 회복을 촉진시키는(도 11a, 도 11b) 작용을 함과 동시에 그 기능의 회복도 증진시킴을 알 수 있다.

<135> 2.2.2) 재생성된 보조 T세포(helper T cells)의 기능회복 증진효과

<136> 방사선(용량 5그레이) 조사 생쥐에서 재생성된 보조 T세포의 기능회복을 본 발명의 조성물이 촉진시키는지 알아보기 위하여 동종 이계(同種異系, allogeneic) 면역세포(allogeneic immune cells)의 자극에 대한 T세포의 반응(Mixed Lymphocyte Reaction; MLR)을 측정하였다.

<137> 본 시료의 투여는 방사선 조사 36, 12시간 전과 30분, 24시간 후에 복강 주사로 하였으며, 그 이후 격일로 3번 복강주사로 실시하였다. 방사선 조사 후 21일째와 36일째 생쥐(C57BL/6; MHC type H-2b)를 희생시켜 비장면역세포를 준비하여 반응세포(responder cells)로 사용하였으며, 자극세포(stimulator cells)로는 BALB/c(H-2d) 생쥐의 비장면역세포를 감마선(3,000 rads)으로 조사하여 죽인 것을 사용하였다. 위의 두 종류의 준비된 세포를 소액 배양용 시험관(96-well flat bottomed microplate)의 각 웰에  $1 \times 10^5$ 개씩 함께 넣고 배양기에서 4일간 배양하였다. 수확하기 전 4시간 동안 2  $\mu$ Ci의 트리튬 티미딘( $^3$ H-thymidine)을 첨가하고 세포수집기(cell harvester)를 이용하여 세포를 수거하였다. 수거된 세포에 신틸레이션 콕테일(scintillation cocktail)을 3 ml씩 넣고 베타-신틸레이션 카운터( $\beta$ -scintillation counter)로 세포가 흡수한 트리튬 티미딘( $^3$ H-thymidine) 양을 분당 카운트 수(cpm)으로 측정하였다.

- <138> 그 결과, 도 13a 및 도 13b에서 보는 바와 같이 본 시료를 투여한 군에서 보조 T 세포의 기능이 방사선 대조군에 비해 더 높게 나타나고 더 빨리 회복되었다. 이 결과에서 본 시료를 투여함에 따라 방사선 조사 후 약 5주 후에는(도 13b) 보조 T 세포의 단위 세포 당 기능은 정상대조군 수준으로 회복됨을 알 수 있다.
- <139> 2.2.3) 방사선 조사 후 나타나는 항체생성 패턴의 변동(불균형)을 조정 정상화 하는 효과
- <140> 방사선(용량 5 그레이) 조사 생쥐에 T세포 의존성 항원 주사 후 항체생성 패턴의 불균형을 본 발명의 조성물이 조정할 수 있는지를 알아보기 위하여 항체 종류별 생산정도를 측정하였다.
- <141> 방사선 조사 전 본 시료 투여군은 조사 36시간과 12시간 전에, 방사선 조사 후 투여군은 조사 후 30분과 24시간 후에 시료를 복강 내로 주사하였다. 그 후 격일로 3회 더 시료를 투여하였다. 방사선조사 후 1, 2, 3, 5, 8주에 단백질항원(DNP-KLH)을 복강 주사한 다음 7일과 14일째 안와정맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 -70℃ 냉동고에 보관하였다가 혈청내 항체의 양을 효소결합항체법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 측정하였다. 마이크로 플레이트(microplate)의 웰에 항원을 코팅한 후 혈청을 각 웰에 넣어 혈청내 항체가 항원과 결합하게 한 다음, 퍼옥시다제 결합 염소 안티마우스 IgG (peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG) 또는 비오틴 결합 안티마우스 IgE(biotin conjugated anti-mouse IgE)를 넣고 결합시켰다. 비오틴-IgE(Biotin-IgE)를 위해서 스트렙타비딘 결합 말 퍼옥시다제 (streptavidin conjugated horse peroxidase )를 넣어 비오틴과 한번 더 결합을 시켰다. 그 후 기질(TMB

substrate)을 넣어 발색시킨 다음, 반응 저지액을 넣고 ELISA 리더(reader)로 파장 450nm(reference wavelength 570nm)에서 흡광도를 측정하였다.

<142> 그 결과 도 14a 및 도 14b에 나타낸 바와 같이 방사선조사 대조군에서는 정상대조군에 비해 IgG의 생산(도 14a)은 감소하는데 반하여 IgE의 생산(도 14b)은 증가하는 것을 볼 수 있으며, 이러한 변동(불균형)은 본시료 투여로 인하여 거의 정상대조군의 수준으로 조정되어 정상화 되는 것을 볼 수 있다.

<143> 2.2.4) 재생성된 자연살해세포(NK세포)의 기능회복 증진효과

<144> 방사선(용량 5그레이) 조사 생쥐에서 재생성된 NK세포의 기능회복을 본 발명의 조성물이 촉진시키는지 알아보기 위하여 비장 림프구를 분리하여 암세포 살해능을 상기 크롬 유리법(2.2항 참조)으로 측정하였다.

<145> 방사선 조사 전 본 시료 투여군은 조사 36시간과 12시간 전에, 방사선 조사 후 투여군은 조사 후 30분과 24시간 후에 시료를 복강내로 주사하였다. 방사선 조사 후 22, 29, 35, 49일째 생쥐로부터 떼어낸 비장세포를 비중원심분리 용액(Ficoll-Hypaque 용액)을 이용하여 림프구를 분리하였다. 이렇게 얻은 림프구를 완전배지에 재부유시켜 작동세포(effect cells)로 하고, 표적세포로서 크롬( $Cr^{51}$ )으로 표지된 암세포(YAC-1 세포)를 준비( $2 \times 10^5/ml$ )하였다. 작동세포 : 표적세포의 비율이 6.5 : 1, 12.5 : 1, 25 : 1, 50 : 1이 되도록 각각 0.1ml씩 소

액 배양 시험관(96 well-round bottomed microplate)의 각 웰에 가한 후 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 후 상층액 0.1ml씩을 취하여 감마카운터( $\gamma$ -counter)로 선량을 측정하였다. 실험은 3배수로 실시하였으며, 작동세포 : 표적세포의 비율 별로 실시한 각 실험에서의 암세포 살해정도(% cytotoxicity)는 상기와 같은 방법으로 (수식 1)에 의하여 계산하였다.

<146> 비장 림프구 전체의 암세포 살해능을 각 개체별로 비교하기 위하여, 일정량의 암세포를 살해하는데 필요한 림프구의 수(LU: lytic unit)를 산출하였다. 여기에서 1 LU<sub>10</sub>은 표적세포의 10%를 살해시키는데 필요한 작동세포의 수로 정의하였다. 이 LU는 용량-반응 곡선(dose response curve)으로부터 직선회귀분석(linear regression analysis)방법으로 산출하였다. 그 다음 림프구  $1 \times 10^7$  개 당 LU의 수를 계산하여 비장 림프구 총수를 곱하여 비장 당 LU의 수를 산출하여 개체 간의 암세포 살해능을 비교하였다.

<147> 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이 방사선 조사로 인하여 NK 세포의 기능(암세포 살해능)이 현저하게 저하되어 방사선 조사 후 오랫동안 회복되지 않고 미흡함을 알 수 있다. 반면에, 본 시료 투여군의 경우 저하된 NK 세포의 기능이 현저하게 회복되어 방사선 대조군에 비하여 약 2배 정도로 높음을 확인할 수 있다.

<148> [실험예 3] 산화적 생체손상 억제효과의 확인

<149> 1) 세포내 DNA 및 염색체 손상 억제효과

<150> 본 발명의 생약조성물 및 각 시료를 첨가하여 세포(림프구)를 4시간 동안 세포배양기에서 배양한 다음, 방사선 혹은 과산화수소수( $H_2O_2$ )를 처리한 후, 세포 내 DNA 및 염색체의 손상정도를 방사선대조군과 비교 검토하였다.

<151> 1.1) DNA 손상 억제효과

<152> 본 발명의 생약조성물이 방사선 및 화학물질에 의한 산화적 손상에 의해 일어나는 세포 내 DNA의 외가닥 절단을 방호할 수 있는가를 확인하기 위하여 단세포전기영동법(Single Cell Gel Electrophoresis; Comet assay)을 이용하여 관찰하였다.

<153> 먼저, 시험된 세포를 아가로즈 겔과 혼합하여 유리 슬라이드(slide) 상에 도말한 후 세포용해 용액(lysis buffer) 속에서  $4^{\circ}C$ 로 1시간동안 용해시켰다. 이 슬라이드를 전기영동 한 후 DNA 염색용액(ethidium bromide,  $20\mu g/ml$ )으로 염색하였다. 전기영동에 의하여 이동된 DNA 파편의 양을 CCD 카메라가 부착된 형광현미경을 사용하여 이미지분석 프로그램(Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)을 통해 분석하였다. DNA 손상정도는 DNA 파편의 이동 거리(tail 길이)와 이동한 부분(tail 내)의 DNA 파편(fragment)의 양을 수치화 시킨 값(tail moment)으로 나타내었으며 테일 모멘트(tail moment) 값이 증가할수록 DNA 손상 정도가 큰 것을 의미한다.

<154> 실험 결과, 본 시료의 투여로 방사선(도 3a) 및 과산화수소수(도 3b) 처리로 유발된 산화적 손상에 의한 DNA 외가닥 절단을 효과적으로 억제하였음을(억제율은 각각 약 49% 및 37%) 확인할 수 있었다.

<155> 1.2) 염색체 손상 억제효과

- <156> 본 발명의 생약조성물이 방사선 및 화학물질에 의한 산화적 손상에 의해 일어나는 염색체 이상(異常, aberration)을 방호할 수 있는가를 확인하기 위하여, 염색체 손상에 의해 세포분열 중에 형성되는 소핵의 빈도를 측정하였다(소핵시험; micronucleus test).
- <157> 먼저, 본 시료를 첨가하여 세포(림프구)를 4시간 동안 배양한 후, 방사선 혹은 과산화수소수( $H_2O_2$ )를 처리하였다. 세포질의 분화를 막기 위해 사이토칼라신B (Cytochalasin B)를 처리하고 24시간 후에 세포를 수확하여, 현미경 검사용 슬라이드 표본을 만들어 염색(Giemsa stain)한 후, 세포핵 분열이 일어난 세포(binucleated cell) 1000개 내에 형성된 소핵(micronucleus)을 계수하였다.
- <158> 그 결과, 본 생약조성물이 방사선(도 4a) 및 과산화수소수(도 4b) 처리로 유발된 산화적 손상에 의한 염색체 이상을 효과적으로 억제함을(억제율은 각각 약 33% 및 64%) 확인할 수 있었다.
- <159> 2) 세포내 지질 및 단백질의 산화 억제효과
- <160> 2.1) 지질의 과산화 억제효과
- <161> 본 발명의 생약조성물이 방사선 및 화학물질에 의한 산화적 손상에 의해 유발되는 세포막의 지질 과산화(lipid peroxidation)를 억제시킬 수 있는가를 확인하기 위하여, 생쥐 간(liver) 조직에서 지질과산화에 의해 생성된 말론디알데하이드(malondialdehyde)의 양을 티비에이분석법(Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay)으로 측정하였다.
- <162> 방사선(8 그레이) 조사 전 36시간, 12시간에 본 시료 및 열수추출물의 각 분획물로 이루어진 각 시료를 생쥐 복강내로 주사하였다.

<163> 화학물질에 의한 산화적 손상 유발의 경우, 사염화탄소( $\text{CCl}_4$ )를 콘 오일(corn oil)과 섞어 생쥐 복강내로 주사하고( $0.5\text{ml/kg}$ ) 18시간 가량 절식시켜 간 손상을 유발시켰다. 이 경우 본 시료 및 열수추출물의 각 분획물로 이루어진 각 시료의 투여는 사염화탄소 처리 전 27시간 및 3시간에 복강주사로 하였다.

<164> 생쥐를 희생시키고 간(liver)을 적출하여, 일정량의 간 조직을 균질화 시켰다. 균질화 시킨 간조직을 단백질량이  $3\text{mg}$ 되게 취한 후 여기에 8.1% 에스디에스(SDS: sodium dodecyl sulfate)  $0.2\text{ml}$ , 20% 초산(acetic acid, pH 3.0)  $1.5\text{ml}$ , 0.8% 티비에이용액(TBA solution)  $1.5\text{ml}$ 을 넣어 고루 섞은 다음,  $95^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 중탕을 한 후  $532\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. 표준액(1,1,3,3-tetraethoxypropane)을 사용하여 구한 표준곡선(standard curve)을 이용하여 검체 내에 생성된 말론디알데하이드(malondialdehyde)의 양을 계산하고 단위 단백질 함량 당 농도( $\text{nmol/mg protein}$ )로 나타내었다.

<165> 실험 결과, 본 시료가 방사선(도 5a) 및 사염화탄소(도 5b)에 의해 유도된 지질과 산화를 효과적으로 억제함을(억제율은 각각 약 71% 및 36%) 알 수 있었다.

<166> 2.2) 단백질의 산화 억제효과

<167> 본 발명의 생약조성물이 방사선을 포함하는 산화적 손상에 의해 유도되는 단백질의 산화를 억제시킬 수 있는가를 확인하기 위하여 생쥐 간 조직에서 단백질 산화로 생성된 카보닐 그룹(Carbonyl groups)의 양을 측정하였다.

<168> 본 시료 및 열수추출물의 각 분획물로 이루어진 각 시료의 투여는 방사선(8 그레이)조사 전 36시간, 12시간에 생쥐에 복강주사로 하였다. 생쥐 간을 적출하여, 일정량의 간 조직을 균질화 시켰다. 균질화 시킨 간조직은 단백질량이  $4\text{mg}$ 되게 취한 후 여기에

동량의 부피만큼 20% TCA(trichloroacetic acid) 용액을 넣어 단백질을 침전시킨 후 10mM DNPH 500 $\mu$ l를 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 동량의 부피만큼 20% TCA 용액을 넣어 원심분리를 시켰다. 상층액을 제거한 후 ethanol-ethyl acetate (1:1) 1ml을 넣어 펠렛(pellet)을 수세한 다음 6M guanidine·HCl 1.2ml을 넣어 다시 원심분리를 시켰다. 상층액을 취하고 분광광도계를 이용하여 370nm에서 흡광도를 측정하였다. 카보닐 그룹의 농도는 molar absorption coefficient로서 22,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>을 사용하여 nmol로 환산하여 carbonyl group/mg protein으로 나타내었다.

<169> 실험 결과, 본 생약조성물이 방사선에 의해 유도된 단백질 산화를 현저하게 억제하여 정상대조군과 비슷한 수준을 유지함을 확인하였다(도 5c).

<170> 3) 자유라디칼(Free Radical) 소거 효과의 확인

<171> 3.1) DPPH 라디칼 소거 효과

<172> 본 발명의 생약조성물이 생체내에 생성된 자유라디칼(free radical) 분자에 전자를 공여함으로써 라디칼의 활성을 소거하는 효과를 알아 보기 위하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 분자 내 라디칼에 대한 전자공여능으로 측정하였다.

<173> 실험에서 각기 다른 농도의 본 시료 및 열수추출물의 각 분획물로 이루어진 각 시료 0.2 ml에 4×10<sup>-4</sup>M DPPH 용액 1.8 ml씩을 가한 후 10초간 진탕하여 30분 후 분광광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 여기에서 DPPH 분자 내에 있는 비공유 전자(라디칼)에 의해 용액이 보라색을 띄게 되는데, 시료가 전자를 공여하게 되면 전자가 쌍을 이루어 이 보라색이 탈색된다. 이 원리를 이용하여



, 시료의 전자공여능(Electron donating abilities, EDA)을 시료 첨가시(반응구)와 비첨가시(대조구)의 흡광도 감소차이를 백분율로 나타내었다.

<174> 
$$\text{EDA}(\%) = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

<175> Ac : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

<176> As : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

<177> 실험 결과, 에탄올분획, 메탄올분획과 열수추출물이 현저하게 높은 전자공여 효과를 보였으며, 다당체분획 및 본 생약조성물도 유의한 효과를 나타냄을 확인하였다 (도 6a).

<178> 3.2) OH 라디칼 소거 효과

<179> 본 발명의 생약조성물이 활성산소종(reactive oxygen species) 중에서 반응성이 매우 강하여 생체의 산화적 손상에 가장 주요한 역할을 하는 OH 라디칼(hydroxyl radical)을 소거하는 효과를 알아 보기 위하여, 시험관 내에서 과산화수소수( $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 처리하여 생성되는 OH 라디칼을 소거하는 활성을 측정하였다 (2-deoxyribose oxidation method).

<180> 시험관에서 0.1mM  $\text{FeSO}_4$ /EDTA 용액 0.2ml, 10mM 2-deoxyribose 0.2ml, 본 시료 및 열수추출물의 각분획물로 이루어진 각 시료 0.2ml과 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2ml을 가하고, 10mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.2ml을 가하여 반응을 개시시켰다. 37℃ 수욕조에서 4시간 반응시킨 후 2.8% TCA(trichloroacetic acid)용액 1ml을 가하여 반응을 중지시키고, 1% TBA(2-thiobarbituric acid)용액 1ml를 가하여 95℃에서 10분간 중탕한 후 냉각하고 UV-

분광광도계를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. OH 라디칼(Hydroxyl radical) 소거활성은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소차이를 백분율로 나타내었다.

&lt;181&gt;

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity(\%)} = \left\{ 1 - \left( \frac{A_s - A_o}{A_c - A_o} \right) \right\} \times 100$$

&lt;182&gt;

Ao : 시료와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하지 않은 음성 대조구의 흡광도

&lt;183&gt;

Ac : 시료를 첨가하지 않은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 대조구의 흡광도

&lt;184&gt;

As : 시료를 첨가한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리구의 흡광도

&lt;185&gt;

실험 결과를 도 6b에 나타내었다. 본 발명의 생약조성물이 가장 높은 효과를 보여 현저하게 OH 라디칼을 소거하는 것을 확인하였다.

&lt;186&gt; [실험예 4] 독성 검사

&lt;187&gt;

본 시료의 급성독성검사 결과 경구투여 및 복강내 주사 시 50% 치사량이 공히 체중 kg 당 2 g 이상으로서 전혀 독성효과를 나타내지 않았다.

### 【발명의 효과】

&lt;188&gt;

본 발명의 생약조성물은 뛰어난 항암 효과, 면역 및 조혈기능 증진효과 및 산화적 생체손상 억제효과를 나타내어 항암제 및 방사선 치료시 발생하는 면역 및 조혈기능 장애의 회복촉진 및 산화적 손상 억제를 통한 항암치료 부작용 방지를 위하여 응용될 수 있으며, 다양한 퇴행성 만성질환의 예방 및 노약자를 위한 건강증진에 광범위하게 이용될 수 있다.

1020030021746

출력 일자: 2003/8/13

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물; 및 동일 무게 비율로 혼합된 당귀, 천궁 및 백작약의 열수추출물에 에탄올을 가하여 생성된 침전물인 다당체분획물로 구성되는, 항암, 면역 및 조혈기능 증진 및 산화적 손상에 대한 생체 방호용 생약조성물.

**【청구항 2】**

제 1항에 있어서, 상기 생약조성물에 포함되어 있는 다당체 분획물의 총량은, 상기 열수추출물에 포함되어 있는 다당체분획물의 양에 대하여 1.5 ~ 4배의 양인 것을 특징으로 하는 생약 조성물.

**【청구항 3】**

제 1항의 생약조성물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료용 약학적 조성물.

**【청구항 4】**

제 1항의 생약조성물을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증강용 약학적 조성물.

【청구항 5】

제 1항의 생약조성물을 유효성분으로 포함하는 조혈기능 증진용 약학적 조성물.

【청구항 6】

제 1항의 생약조성물을 유효성분으로 포함하는 산화적 손상에 대한 생체방호용 약학적 조성물.

【청구항 7】

제 1항의 생약조성물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 부작용 방지용 약학적 조성물.

【청구항 8】

제 1항의 생약조성물을 포함하는 항암치료용, 면역기능 증강용, 조혈기능 증진용, 산화적 손상에 대한 생체방호용, 항암 치료 부작용 방지용 기능성 식품

【청구항 9】

1) 동일 무게 비율의 당귀, 천궁 및 백작약으로 이루어진 혼합 생약재에 상기 생약재의 총 무게의 5 내지 20배 량의 물을 가한 후 열수추출하여 열수추출물을 준비하는 제 1단계;

2) 상기 제 1단계와 동일한 열수추출물에 에탄올을 가하여 얻어진 침전물을 회수하여 다당체분획물을 얻는 제 2단계;

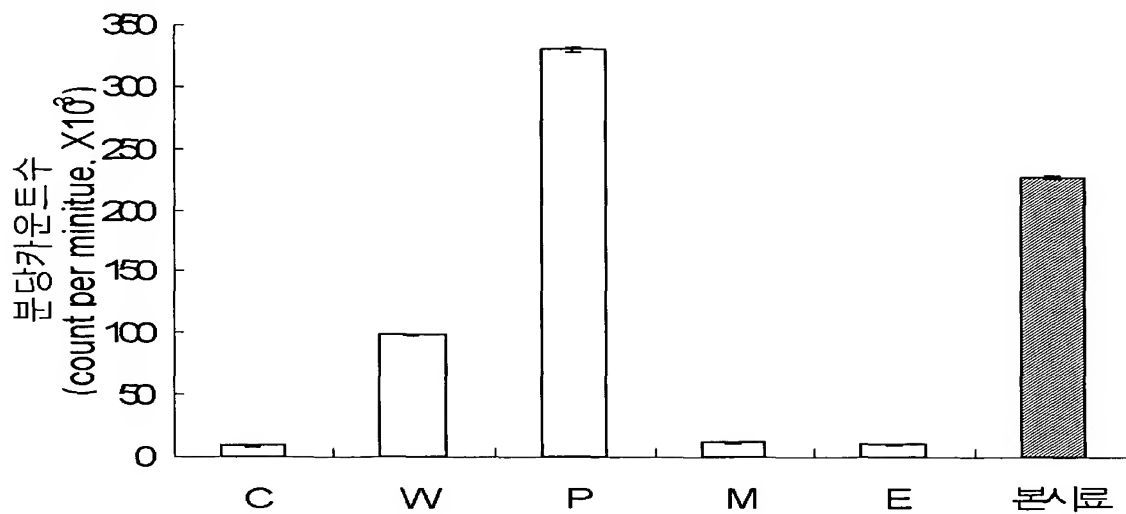
3) 제 1단계의 열수추출물에 제 2단계의 다당체분획물을 첨가하여 혼합 조성물을 얻는 제 3단계를 포함하여 이루어진 생약조성물의 제조방법.

【청구항 10】

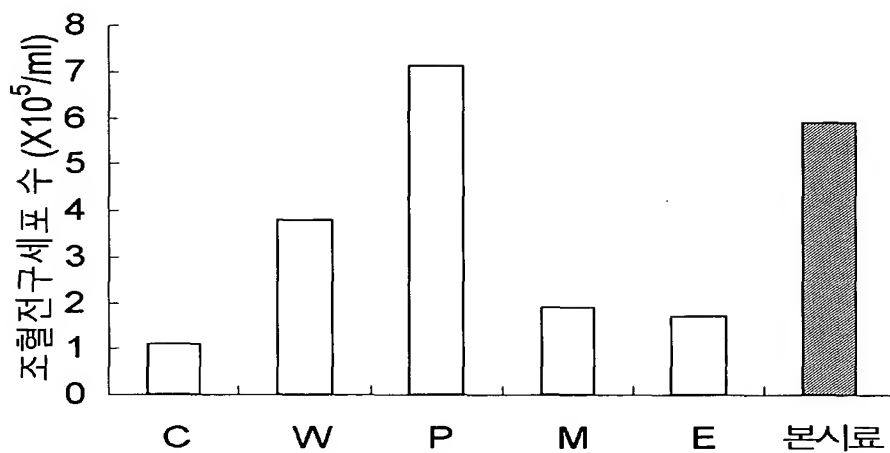
제 9항에 있어서, 상기 제 1단계에서 준비된 열수추출물의 양에 대하여 상기 제 2단계에서 다당체분획물을 얻기 위한 열수추출물의 양을 0.5 ~ 3배로 하는 것을 특징으로 하는 생약조성물의 제조방법.

【도면】

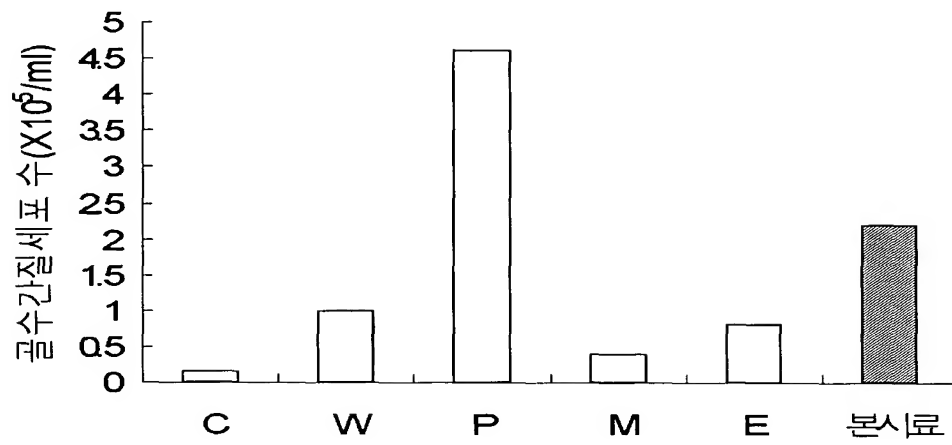
【도 1】



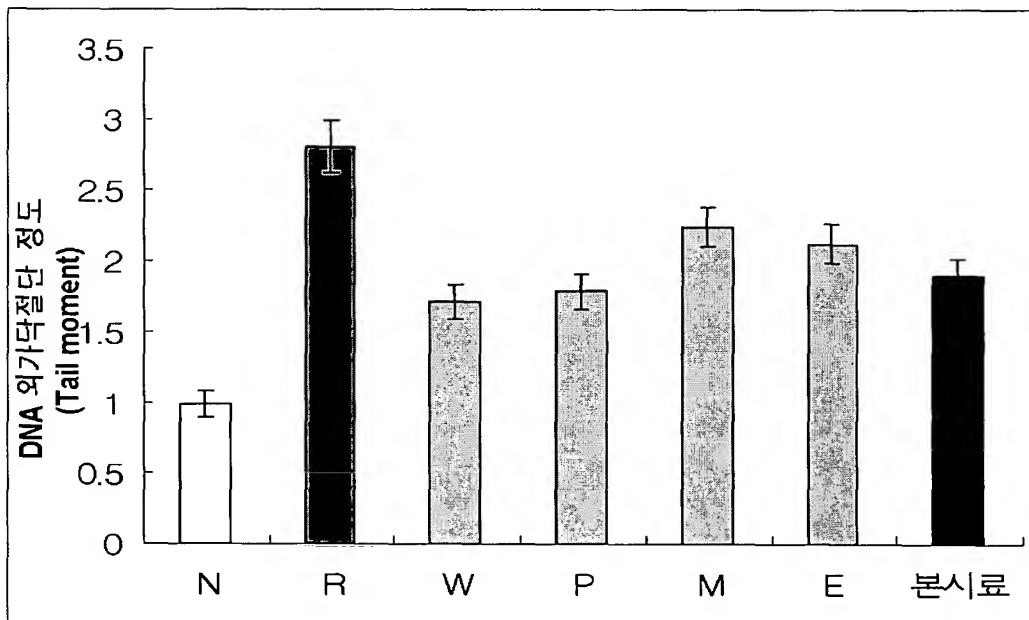
【도 2a】



【도 2b】

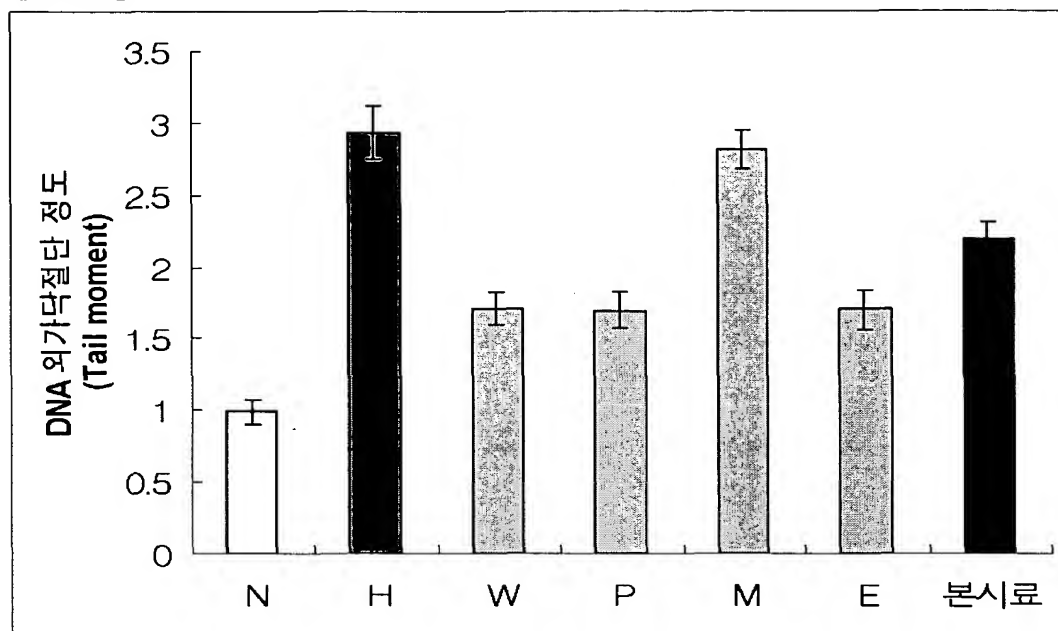


【도 3a】

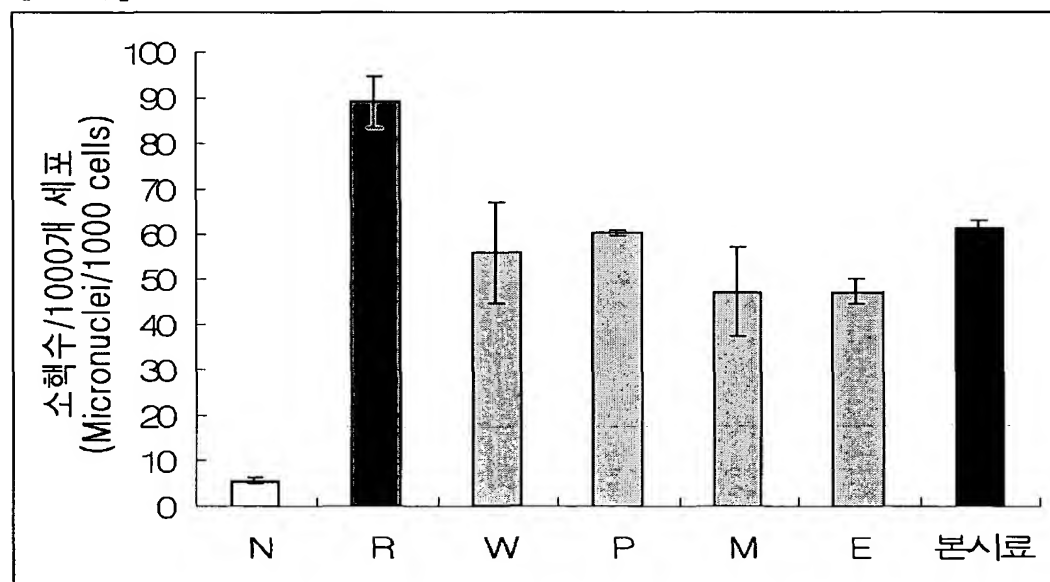




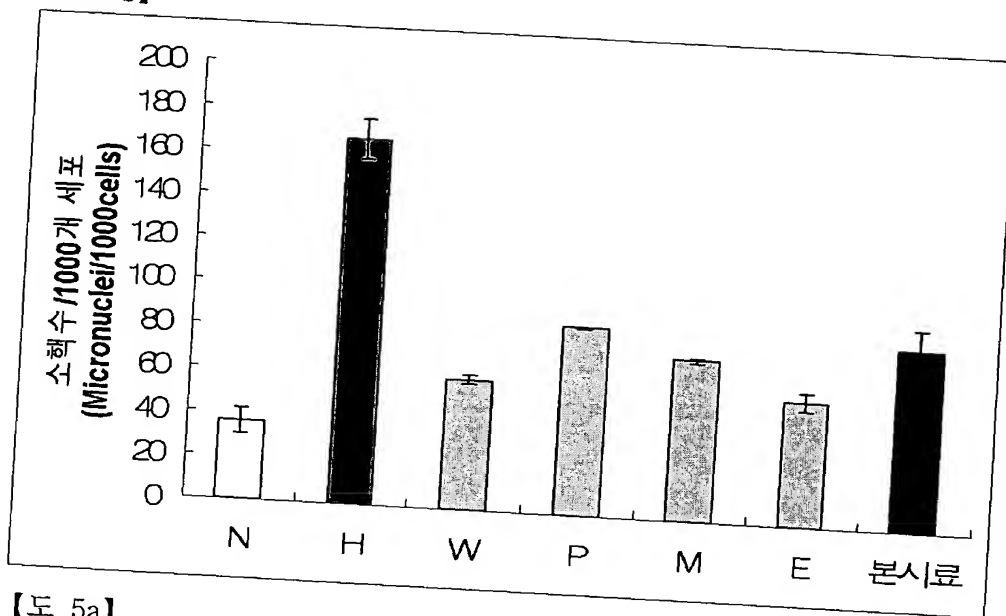
【도 3b】



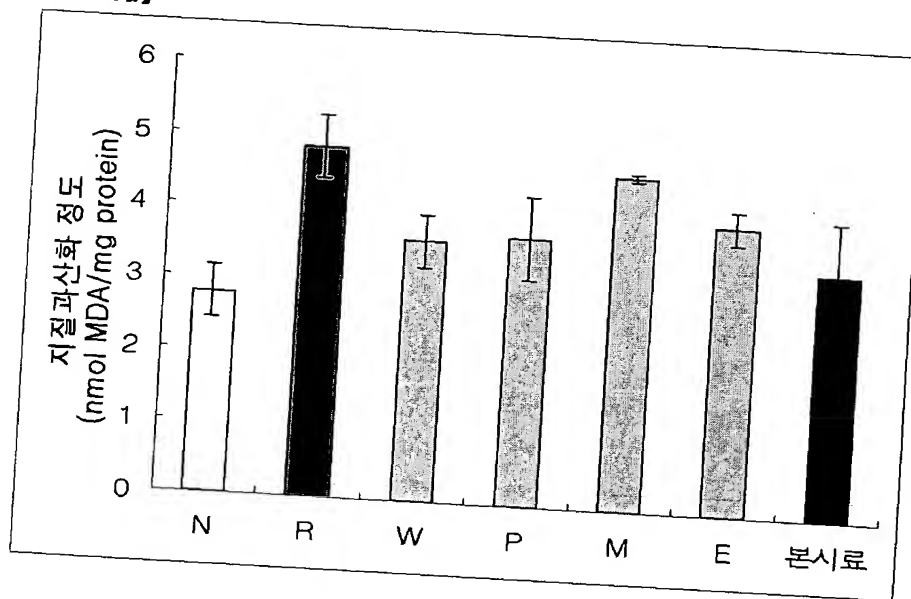
【도 4a】



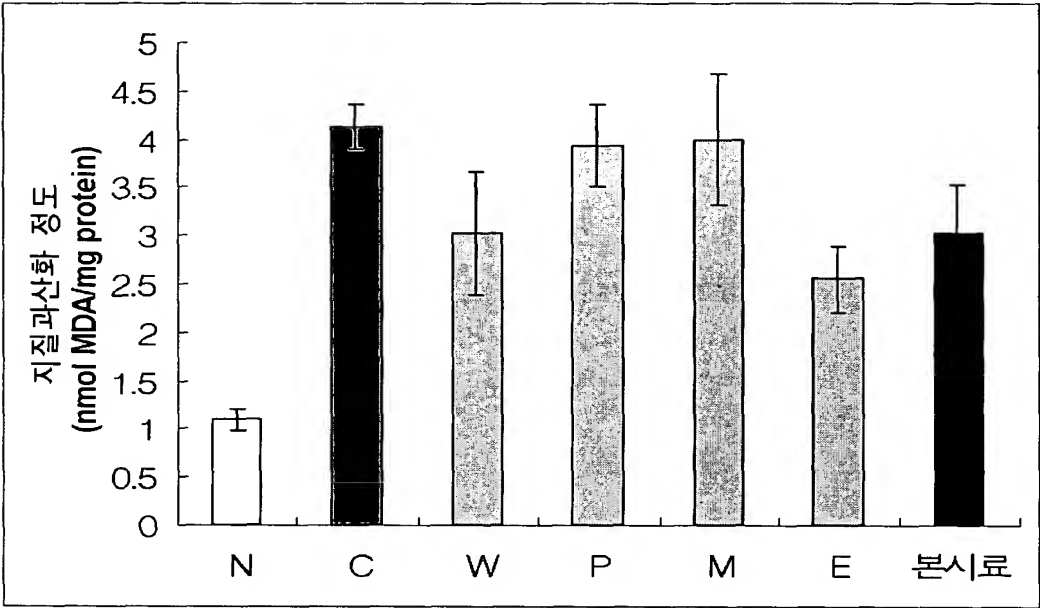
【도 4b】



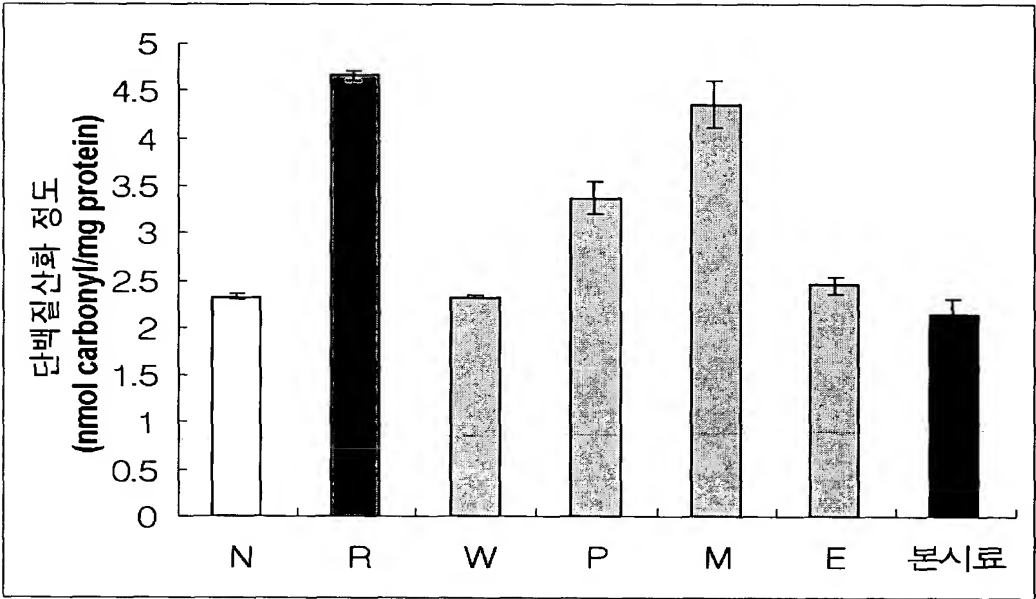
【도 5a】



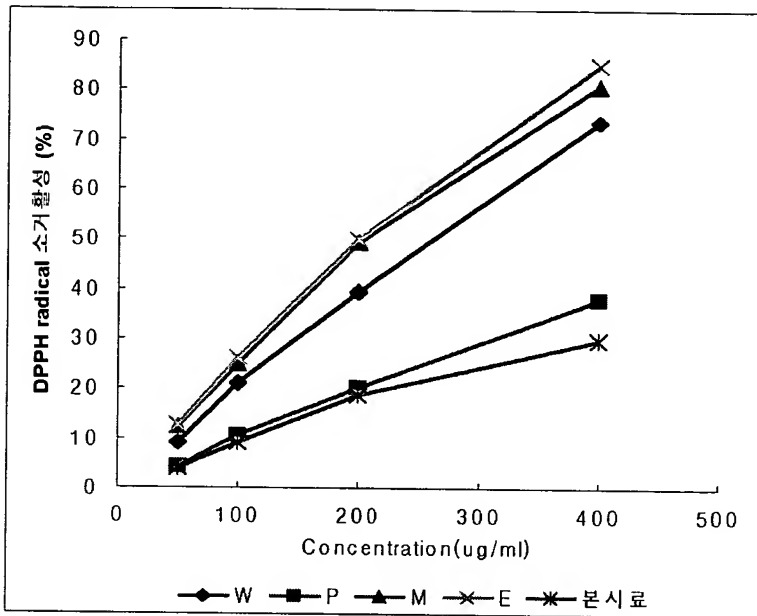
【도 5b】



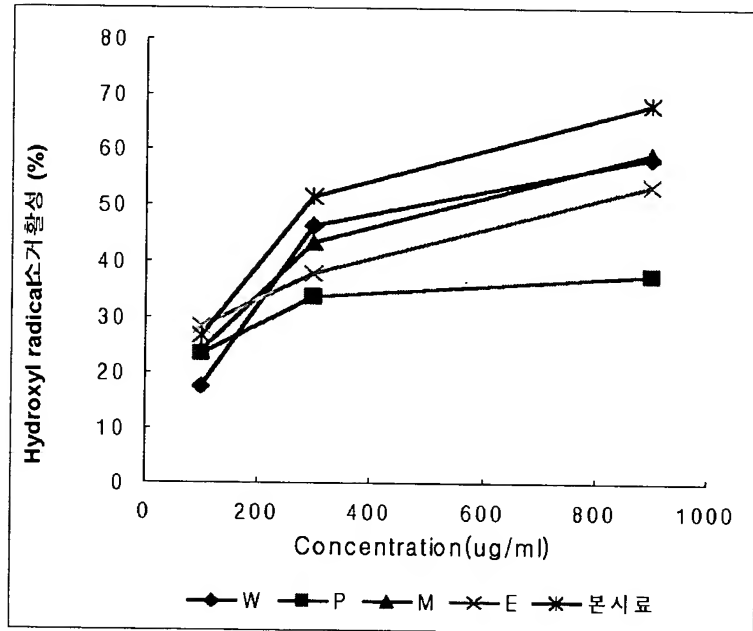
【도 5c】



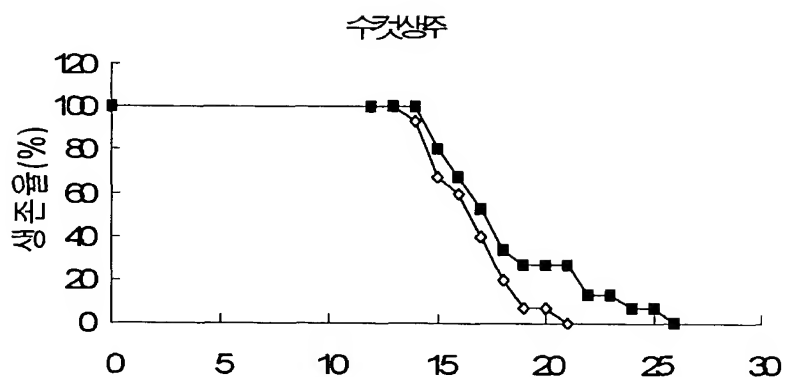
【도 6a】



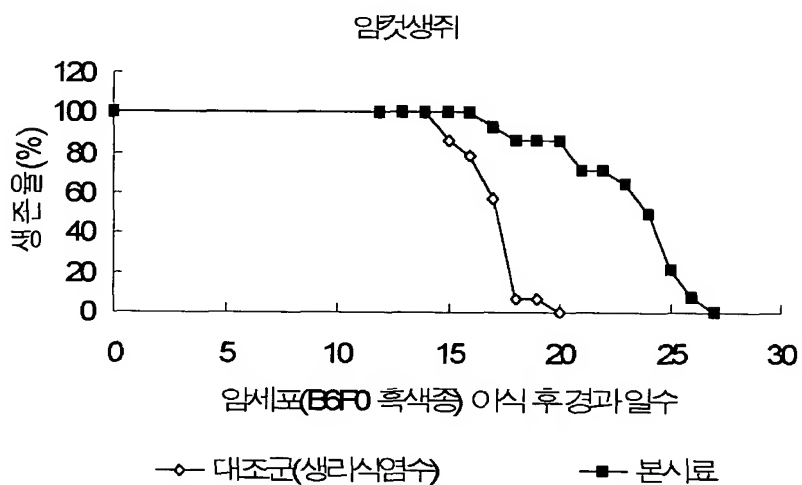
【도 6b】



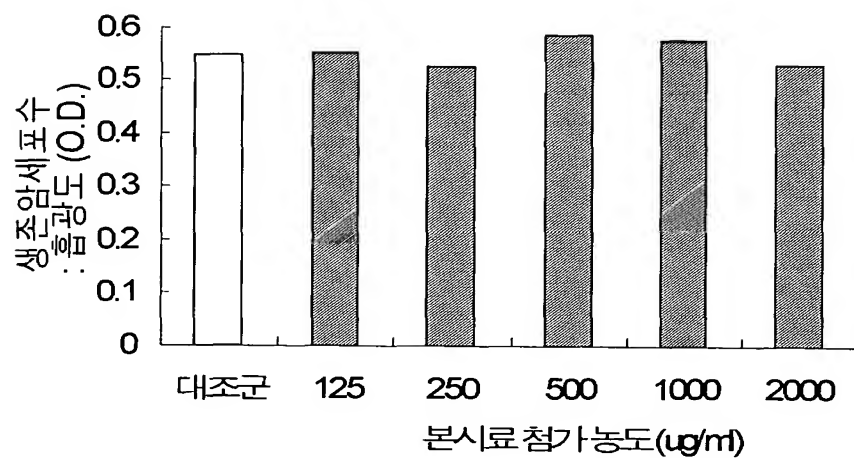
【도 7a】



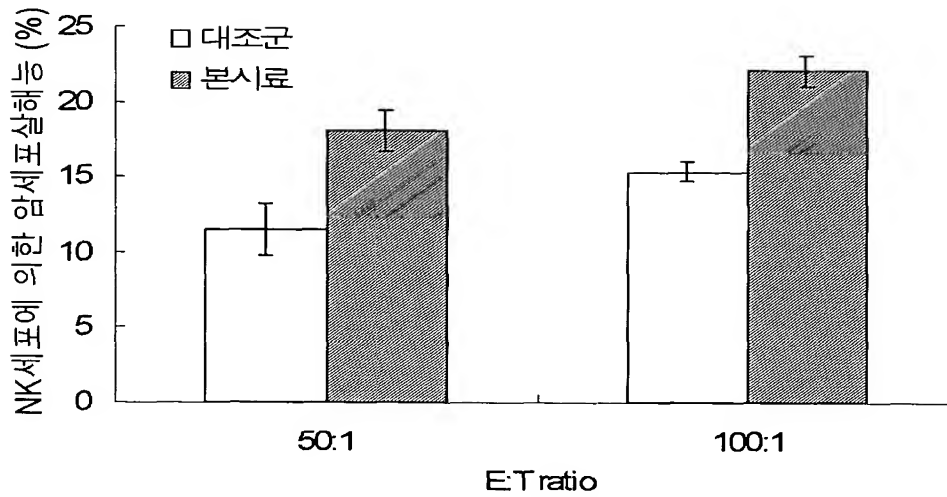
【도 7b】



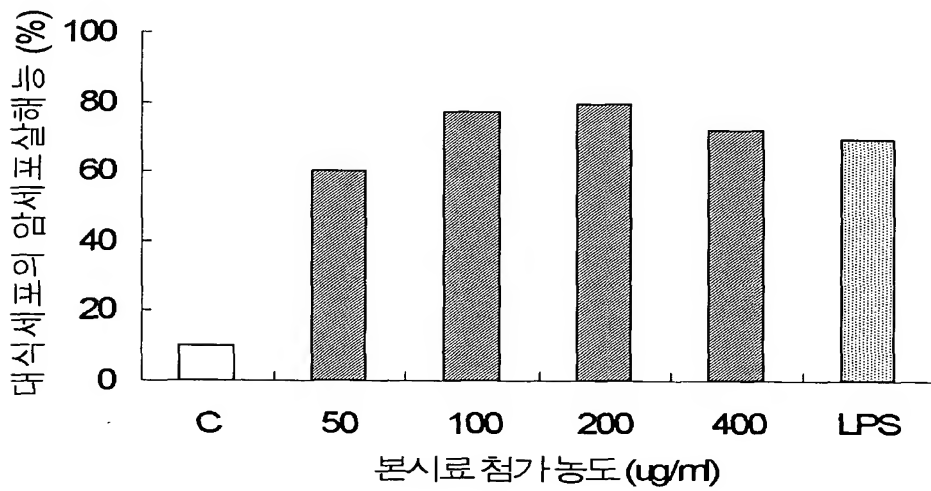
【도 8】



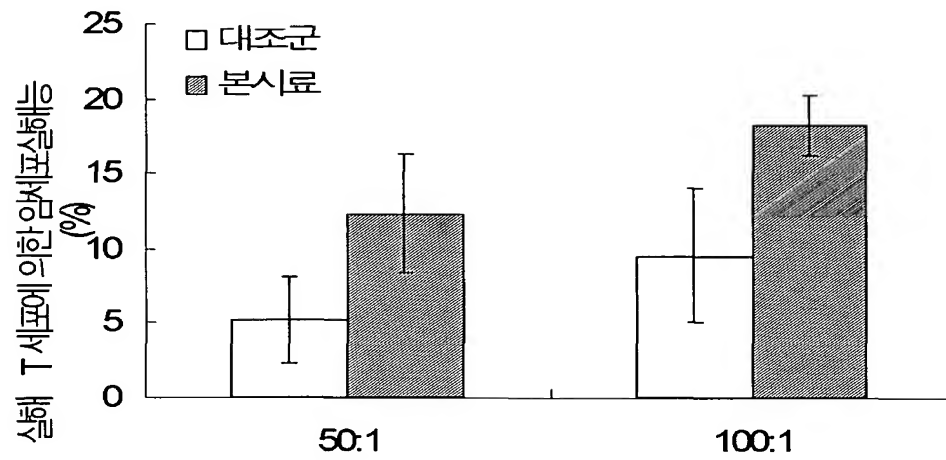
【도 9a】



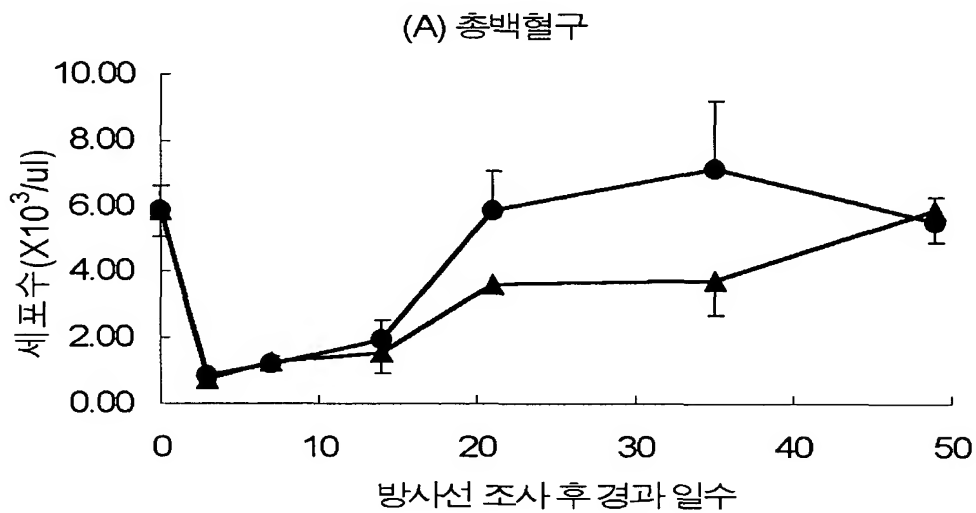
【도 9b】



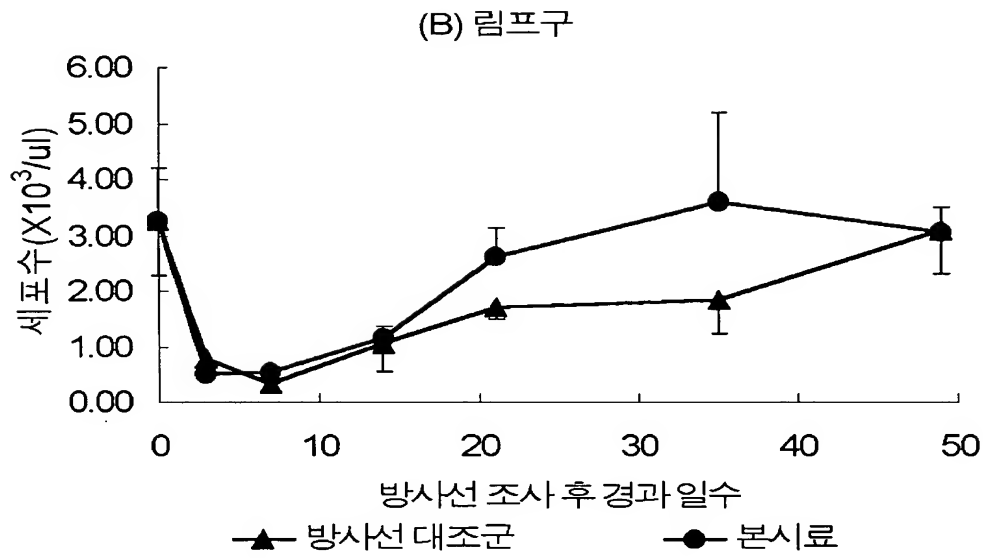
【도 9c】



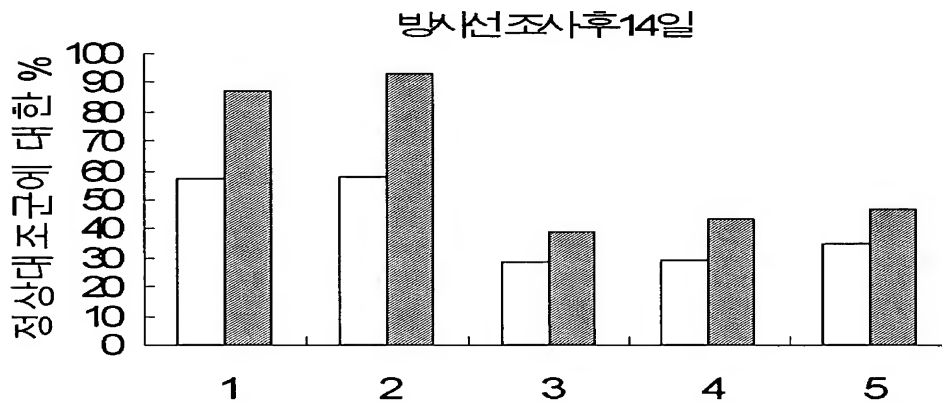
【도 10a】



【도 10b】

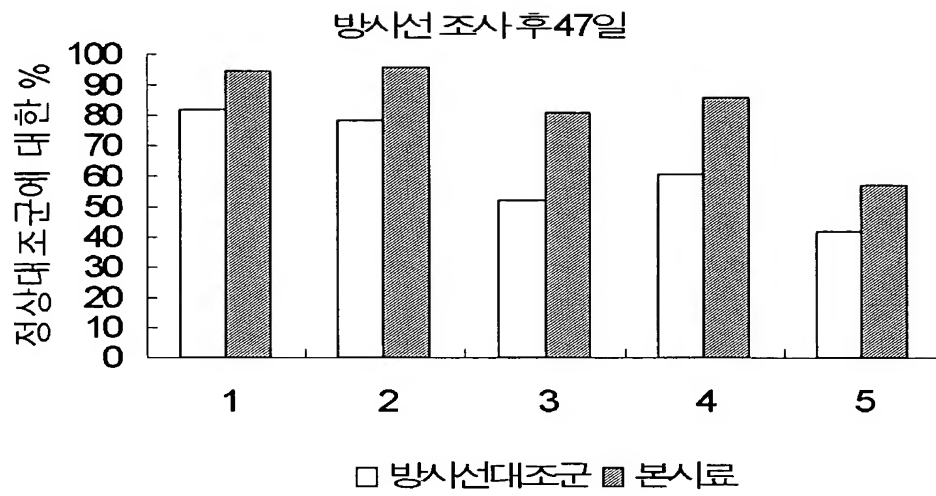


【도 11a】

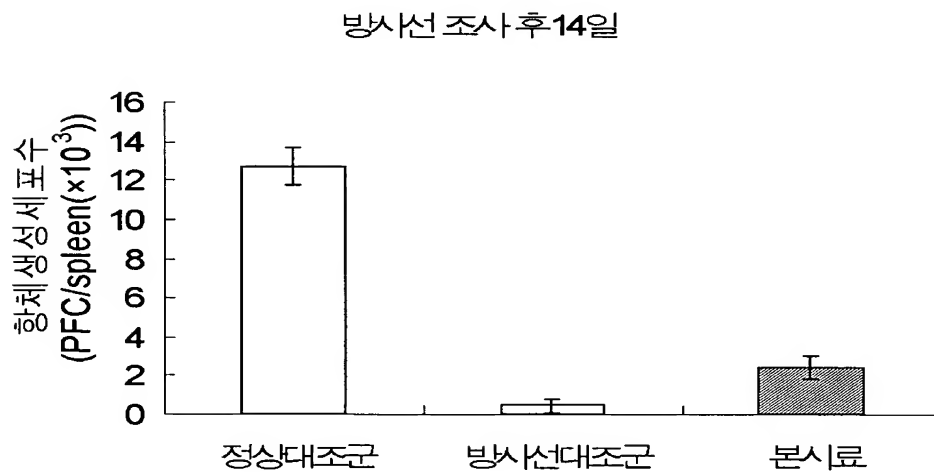




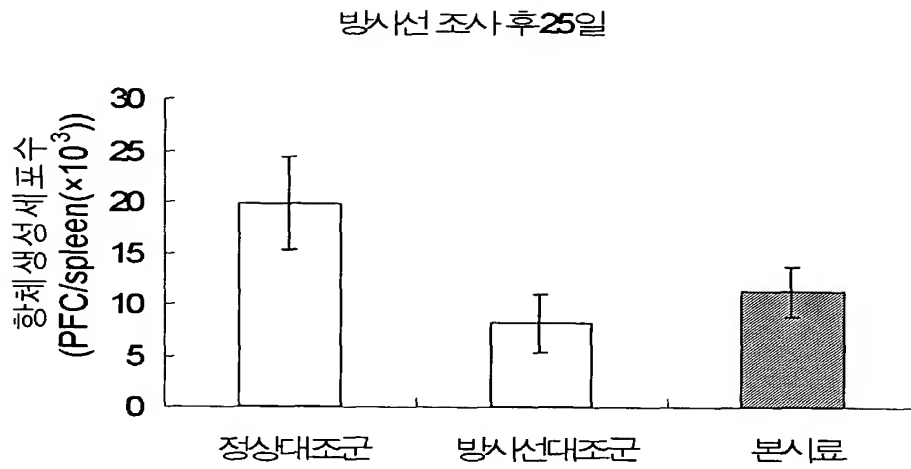
【도 11b】



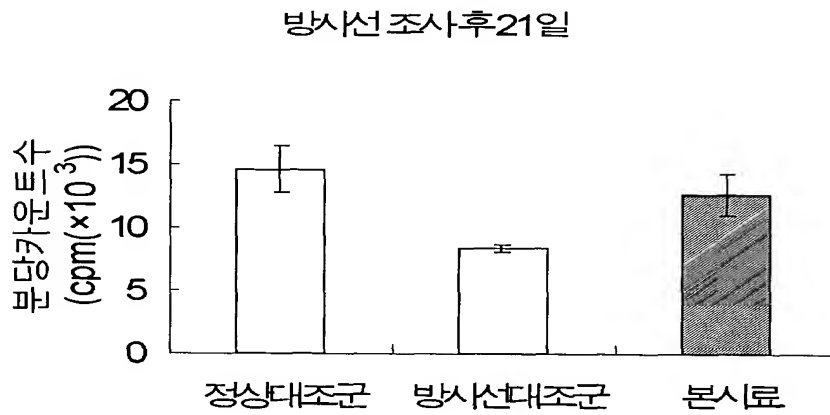
【도 12a】



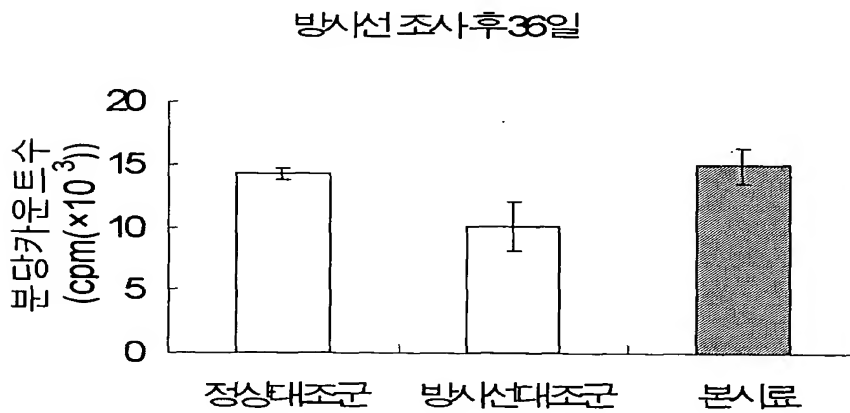
【도 12b】



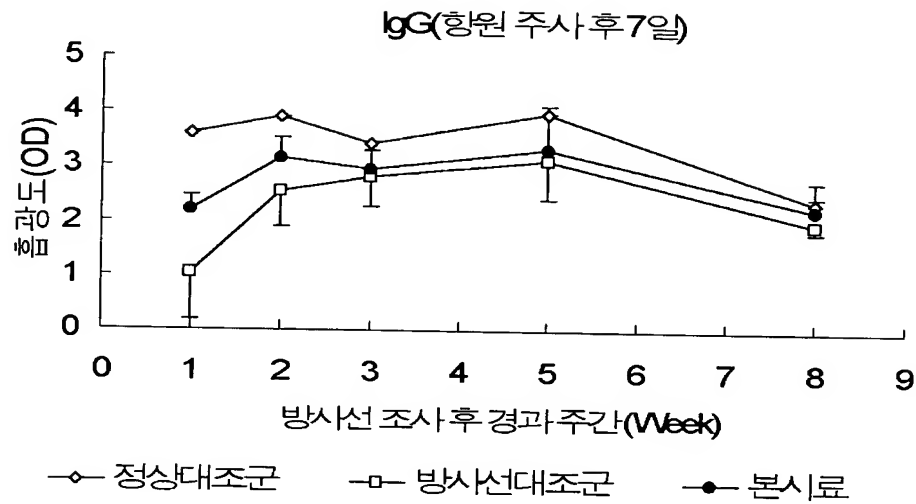
【도 13a】



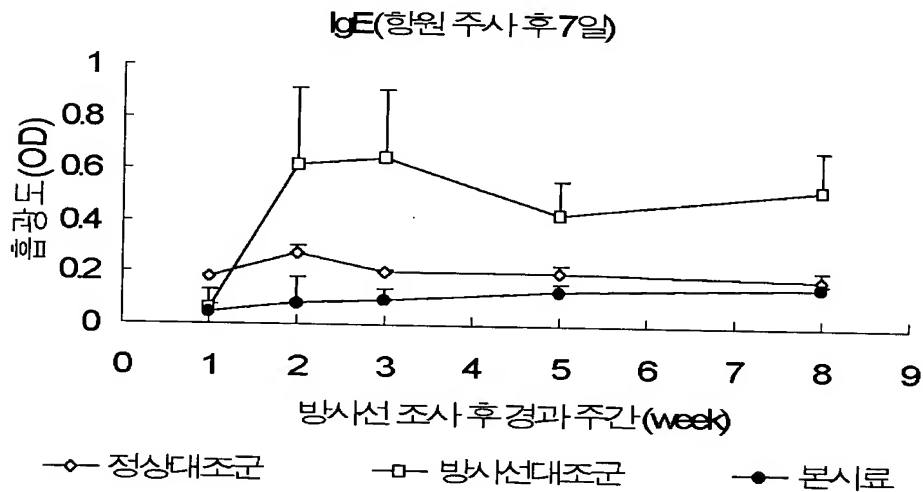
【도 13b】



【도 14a】



【도 14b】



【도 15】

